LUCIANA NOGUEIRA DE SOUSA ANDRADE

**Evidência da dualidade funcional de galectina-3
no crescimento de melanoma murino**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências**

Área de concentração: Oncologia
Orientador: Dr. Roger Chammas

São Paulo

2007

*There are more things in the heaven and earth,
Horatio/Than are dreamt of your philosophy.*

Hamlet, W. Shakespeare

Yes, but we are working on it!
Unweaving the rainbow, Richard Dawkins

Dedicatória

Camundongo da linhagem C57BL/6

A todos animais que contribuem para o progresso da ciência.

ÍNDICE

ÍNDICE	I
LISTA DE ABREVIATURAS	III
RESUMO	V
ABSTRACT	VII
INTRODUÇÃO	1
Tumores como microambientes compostos por diferentes tipos celulares.	1
Imunidade inata e câncer: o papel de macrófagos na progressão de tumores.	3
Neutrófilos e câncer: efeito pró versus anti-tumoral.	6
Outros tipos de células da imunidade inata envolvidas com a progressão de tumores.	6
Angiogênese tumoral como resultado das interações entre os diferentes tipos celulares do microambiente.	7
Lectinas, galectinas e galectina-3.	14
Galectina-3 e câncer.	19
Galectina-3: importante molécula moduladora do processo inflamatório. Uma possível correlação com a progressão de tumores?	25
OBJETIVO GERAL	29
Objetivos específicos	29
METODOLOGIA	31
1. Manutenção de células em cultura.	31
Animais	32
2. Análise do acúmulo de galectina-3 por <i>Western Blot</i>	32
2.1 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares.	32
2.2 Quantificação protéica.	33
2.3 Eletroforese e transferência para membrana PVDF.	33
3. Curva de proliferação de células Tm1 gal-3 ⁻ e Tm1 gal-3 ⁺ <i>in vitro</i>	35
4. Ensaio de sensibilidade dos clones Tm1 gal-3 ⁻ e Tm1 gal-3 ⁺ à estaurosporina.	35
5. Cinética de implantação de tumores derivados de células Tm1 gal-3 ⁻ e Tm1 gal-3 ⁺ e caracterização morfológica do microambiente tumoral no coxim plantar de camundongos selvagens C57BL/6.	36
6. Histo e imunoistoquímica do microambiente de tumores implantados no coxim plantar e no subcutâneo de camundongos C57BL/6.	37
7. Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o gene de galectina-3.	39
8. Extração, quantificação e integridade do RNA dos tumores	39
9. Ensaio de proteção à ribonuclease (<i>Ribonuclease Protection Assay-RPA</i>).	41
10. Análise morfométrica dos cortes imunoquímicos de tumores subcutâneos.	43
11. Análise estatística.	44
RESULTADOS	46
Acúmulo de galectina-3 em células de melanoma murino Tm1 transfectadas.	46
Crescimento de células Tm1 gal-3 ⁻ e Tm1 gal-3 ⁺ <i>in vitro</i>	46
Sensibilidade à morte de células Tm1 gal-3 ⁻ e Tm1 gal-3 ⁺	46
Cinética de recrutamento de células estromais galectina-3 positivas no microambiente tumoral no coxim plantar de camundongos C57/BL6 selvagens.	47

Análise da transplantabilidade e do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3.....	49
Análise do microambiente tumoral subcutâneo de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3.	50
Análise da expressão gênica de fatores angiogênicos no microambiente tumoral-ensaio de proteção a ribonuclease.	53
DISCUSSÃO	66
Galectina-3 na proliferação e sensibilidade à morte em células de melanoma murino Tm1.	66
Galectina-3 na implantabilidade de melanoma murino <i>in vivo</i>	71
Galectina-3 no crescimento tumoral de melanoma murino <i>in vivo</i> : evidências da participação de galectina-3 na angiogênese tumoral.....	74
Insight mecanístico do processo de angiogênese modulado por galectina-3 em melanoma murino.....	84
CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA: análise de variância

APS: perssulfato de amônio

aFGF ou FGF-1: fator de crescimento de fibroblasto ácido

bFGF ou FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto básico

CRD: domínio de reconhecimento de carboidrato

CSF-1: fator estimulador de colônia 1 (*colony stimulating factor-1*)

DAB: 3,3-tetraidrocloro de diaminobenzidina

DEPC: dietil pirocarbonato

DMSO: dimetilsulfóxido

DTT: dietiltritol

EDTA: ácido etileno diamino tetraacético

GAPDH: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

MOPS: 3-(N-morfolino)-ácido propanosulfônico

PBS: tampão fosfato salina

PCNA: antígeno nuclear de proliferação celular

PDGF: fator de crescimento derivado de plaqueta

PMSF: fenilmetilsulfonilfluoreto

PVDF: do inglês, *Hydrophobic polyvinylidene difluoride*

SDS: dodecil sódio sulfato

TAMs: macrófagos associados a tumores (*Tumor-Associated Macrophages*)

TEMED: N,N,N,N tetra metiletilenodiamina

TGF- β : fator de crescimento transformante β

TIE-2 e -1: receptores de angiopoietina 1 e 2

UTP: uridina trifosfato

VEGF ou VEGF-A: fator de crescimento de endotélio vascular-A

VEGF-C: fator de crescimento de endotélio vascular-C

VEGFR-1 (ou Flt-1): receptor do fator de crescimento de endotélio vascular-1

VEGFR-2 (ou Flk-1/KDR): receptor do fator de crescimento de endotélio vascular-2

VEGFR-3 (ou Flt-4): receptor do fator de crescimento de endotélio vascular

RESUMO

Tumores são definidos como microambientes compostos não só pelas células malignas, mas também por células endoteliais, fibroblastos e leucócitos, que promovem o crescimento tumoral e a angiogênese. Galectina-3, uma proteína que se liga a β -galactosídeos, é abundantemente expressa por monócitos/macrófagos, dentre outros leucócitos. Inúmeras evidências sugerem que galectina-3 atua como uma molécula reguladora da resposta inflamatória. Tendo em vista que o infiltrado inflamatório pode promover a progressão de tumores, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se galectina-3, expressa tanto pela célula tumoral como pelas células estromais, modula o crescimento de melanoma. Para tal, células de melanoma murino Tm1 foram transfectadas com o gene de galectina-3. Ambos clones celulares (galectina-3 positivos e negativos) foram injetados na intrafáscia ou no subcutâneo de camundongos (fêmeas) C57BL/6 selvagens e/ou nocautes para o gene de galectina-3 para análise da implantabilidade e crescimento tumoral. Com relação à implantabilidade, não foi observado diferenças no estabelecimento de uma massa tumoral proliferativa em animais selvagens inoculados com células Tm1 transfectadas ou não com o gene de galectina-3 em animais selvagens.

Em relação a taxa de crescimento dos tumores, nenhum animal nocaute inoculado com células Tm1 galectina-3 positivas apresentou tumores de dimensões mensuráveis até o 11º dia pós-inóculo. Independente do nível de expressão de galectina-3 pela célula tumoral, os tumores originados nos animais nocautes apresentavam menor massa em gramas comparados ao grupo selvagem, sugerindo que galectina-3 expressa

pelas células estromais promove o crescimento tumoral. Ainda, os tumores originados nos animais nocautes e no grupo selvagem inoculado com células Tm1 galectina-3 positivas apresentavam menor extensão de área necrótica do que os animais selvagens inoculados com células Tm1 galectina-3 negativas. Interessantemente, os animais selvagens e nocautes inoculados com células Tm1 galectina-3 positivas apresentaram tumores com menor área vascular e menor número de estruturas vasculares funcionais quando comparados aos animais selvagens inoculados com células Tm1 galectina-3 negativas. A análise de expressão gênica nos tumores mostrou que os níveis relativos de RNAm de VEGF (fator de crescimento de endotélio vascular) foram menores nos animais inoculados com células Tm1 galectina-3 positivas em relação aos inoculados com células Tm1 galectina-3 negativas, indicando que galectina-3 expressa pelas células tumorais atua como uma molécula anti-angiogênica. Finalizando, o presente trabalho sugere que galectina-3 pode atuar como uma molécula pró- ou anti-tumoral, dependendo do tipo celular que a expressa no microambiente tumoral.

Descritores: melanoma, galectina-3, neovascularização patológica

ABSTRACT

Tumors have been described as microenvironments composed not only by malignant cells, but also by endothelial cells, fibroblasts and leukocytes, which can promote tumor growth and angiogenesis. Galectin-3, a β -galactoside binding protein, is expressed by monocytes/macrophages and others leukocytes. In fact, several lines of evidence suggest that galectin-3 act as master regulators of the inflammatory response. Based on the fact that the inflammatory infiltrate can promote tumor progression, the proposal of this study was to evaluate if galectin-3, either from tumor or stromal cells could modulate melanoma growth. Tm1 murine melanoma cell line was transfected with the galectin-3 gene. Both clones (galectin-3 negative and positive) were injected in the foot pad or subcutaneous in female C57BL/6 wild-type (WT) and galectin-3 knock-out (KO) mice to tumor engraftment and growth analysis. There was no difference in the tumor engraftment between animals injected with Tm1 galectin-3 positive or negative cells.

In addition, any knock-out mice injected with galectin-3 positive cells had measurable tumors up to day 11 post inoculation. Regardless the galectin-3 expression level in the melanoma cell, tumors from galectin-3 KO mice were smaller than those from WT animals, suggesting that galectin-3 expressed by stromal cells promotes tumor growth. Moreover, tumor necrotic area was smaller in KO mice and in wild-type animals injected with Tm1 galectin-3 positive cells compared to wild type animals injected with Tm1 galectin-3 negative cells. Interestingly, both vascular area and the number of functional vessels in animals injected with galectin-3 positive Tm1 cells were smaller in

WT as well as in KO mice compared to the same animals injected with galectin-3 negative Tm1 cells. Gene expression analysis showed that VEGF (vascular endothelial growth factor) mRNA levels were smaller in wild type animals injected with Tm1 galectin-3 positive cells compared to those injected with Tm1 galectin-3 negative cells, indicating that galectin-3 expressed by tumor cells can act as an anti-angiogenic molecule. The present study suggests that galectin-3 can act either as a pro or anti-tumoral molecule, depending on which type of cell (tumoral or stromal) this lectin is expressed within tumor microenvironment.

Descriptors: melanoma, galectin-3, neovascularization pathologic

INTRODUÇÃO

Tumores como microambientes compostos por diferentes tipos celulares.

Desde o início do século 20, o aparecimento de tumores em indivíduos de uma mesma família propulsionou a busca por alterações genéticas responsáveis por essa patologia. Nas décadas seguintes, um extraordinário avanço na identificação de alterações moleculares responsáveis pelo processo de carcinogênese foi determinante na definição de tumorigênese como um processo composto por múltiplas etapas nas quais as células cancerígenas acumulam alterações genéticas distintas (Hanahan & Weinberg, 2000). Essa visão centrada no genoma das células tumorais levou a identificação e caracterização de muitos oncogenes e genes supressores tumorais que conferem às mesmas capacidades proliferativa ilimitada, insensibilidade a fatores inibidores de crescimento, além de capacidade migratória e invasiva, modelando assim o comportamento biológico de tumores malignos. Entretanto, tal modelo ignora a heterogeneidade e natureza complexa do tecido tumoral e subestima o papel do estroma no processo de transformação maligna (Mueller & Fusenig, 2004; Smalley *et al.*, 2005; Axelrod *et al.*, 2006).

Atualmente, a idéia prevalente é a de que tumores sejam microambientes constituídos pelas células malignas e por células não transformadas (células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos, adipócitos, células imunes e inflamatórias; a esse conjunto de células denominou-se células estromais) que interagem entre si, delineando o comportamento biológico da célula tumoral propriamente dita e, portanto, sendo elementos determinantes do processo de progressão tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Stephan Paget (1889) foi pioneiro em abordar uma possível influência do

microambiente no crescimento de tumores, observando o aparecimento de clones metastáticos em órgãos específicos de pacientes com câncer de mama. Paget propôs que o estabelecimento de colônias metastáticas é dependente de um ambiente permissivo ao crescimento de tumores (*soil*), o qual é modelado pelas próprias células tumorais (*seed*) (“*Seed and soil hypothesis*”) (revisado em Beacham & Cukierman, 2005).

Parte da compreensão do papel das células não transformadas (estromais) na biologia de tumores se deve aos achados clínicos e epidemiológicos que mostram a existência de uma correlação positiva entre inflamação crônica e câncer. Infecções persistentes por agentes bacterianos e/ou virais e a exposição prolongada a carcinógenos ambientais podem levar a um estado de inflamação crônica, o qual, por sua vez, constitui um ambiente propício ao surgimento de neoplasias malignas (De Palma & Naldini, 2006). Cânceres associados a processos inflamatórios crônicos incluem câncer de pulmão, estômago, esôfago, pâncreas, bexiga, próstata, cólon retal e cervical, que são os tumores mais comuns e letais em indivíduos adultos (Gloeckler *et al.*, 2003; Vakkila & Lotze, 2004). Fatores liberados pelas células inflamatórias recrutadas para sítios de inflamação (como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, prostaglandinas, leucotrienos, dentre outros) juntamente com as elevadas taxas de proliferação e morte celular que ocorrem nesses sítios, podem acelerar o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que afetam a função de proto-oncogenes e genes supressores tumorais em células somáticas. Ainda, a liberação de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas pelas células inflamatórias podem acelerar a progressão neoplásica nas células somáticas mutadas (Hussain *et al.*, 2003; Vakkila & Lotze, 2004; Pikarsky *et al.*, 2004; Greten *et al.*, 2004; De Palma & Naldini, 2006).

Em adição, recentemente revisitou-se a noção de que condições inflamatórias não relacionadas a infecções por microorganismos estão associadas ao desenvolvimento de tumores, corroborando a importância das inter-relações entre células malignas e células não transformadas (estromais) na progressão tumoral. A primeira descrição da presença de um infiltrado de leucócitos em tumores foi feita por Virchow em 1863. O infiltrado de células imunes em tumores pode suprimir o crescimento e conseqüente progressão da neoplasia maligna (Clark *et al.*, 1989; Clemente *et al.*, 1996; Mihm *et al.*, 1996; Naito *et al.*, 1998; Nakano *et al.*, 2001; Brigati *et al.*, 2002; Tsung *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2006). Por outro lado, muitos trabalhos mostram que células do sistema imune, como macrófagos, neutrófilos e mastócitos, por exemplo, podem promover a progressão de tumores (revisado em Coussens & Werb, 2002; de Visser & Coussens, 2005; de Visser *et al.*, 2006).

Imunidade inata e câncer: o papel de macrófagos na progressão de tumores.

Muitos são os estudos clínicos que associam a alta densidade de macrófagos intra-tumorais a um mau prognóstico em carcinoma de mama (Valkovic *et al.*, 1998; Saji *et al.*, 2001; Leek & Harris, 2002; Tsutsui *et al.*, 2005), bexiga (Amann *et al.*, 1998), cabeça e pescoço (Marcus *et al.*, 2004), esôfago (Koide *et al.*, 2004), endométrio (Salvesen & Akslen, 1999) e em melanoma de retina (Makitie *et al.*, 2001). Os macrófagos intra-tumorais, denominados TAMs (do inglês, *Tumor-Associated Macrophages*), promovem o crescimento de tumores através de diferentes mecanismos ainda não totalmente elucidados. Em 2004, Pollard descreveu de modo muito intrigante o papel desses leucócitos na progressão de tumores. Essas células podem ser induzidas pelas próprias células tumorais a secretarem citocinas pró-angiogênicas e fatores de

crescimento, por exemplo, deixando de exercer sua função tumorícida e promovendo o crescimento e progressão do tumor. Essa função trófica foi claramente demonstrada na progressão de adenocarcinoma de mama para carcinoma *in situ* e invasivo, a qual foi retardada em camundongos nocautes para CSF-1 (*colony stimulating factor*-1, fator estimulador de colônia 1, importante fator de crescimento de macrófagos), que apresentavam número reduzido de macrófagos em relação aos animais selvagens (Lin *et al.*, 2001). Outros trabalhos mostram a existência de uma correlação positiva entre macrófagos intra-tumorais, vascularização e prognose. Os macrófagos acumulam-se em áreas de pouca vascularização (regiões de hipóxia) e em áreas necróticas da massa tumoral, contribuindo de maneira direta e indireta na formação de novos vasos nessas regiões (revisado em Ribatti *et al.*, 2004).

Significante progresso na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na função trófica de TAMs foi feito principalmente nos últimos 20 anos. Essas células contribuem para o desenvolvimento de tumores através de diferentes mecanismos que se baseiam na secreção de citocinas e fatores de crescimento que inibem uma resposta anti-tumoral e/ou induzem processos biológicos distintos da progressão de tumores (Lu *et al.*, 2006). A secreção de interleucina 10 (IL-10) e prostaglandina E₂ (PGE₂), por exemplo, são mediadores da resposta anti-tumoral de TAMs (Elgert *et al.*, 1998). Já a produção do fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), do ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA) e de endotelina-2 promovem a formação de novos vasos sanguíneos na massa tumoral (angiogênese tumoral, processo esse melhor desenvolvido adiante) (Hildenbrand *et al.*, 1998; Knoop *et al.*, 1998; Hildenbrand *et al.*, 1999; Bando & Toi, 2000; Foekens *et al.*, 2000; Fox *et al.*, 2001; Grimshaw *et al.*, 2002; Pollard, 2004). Endotelina-2 e VEGF exercem função quimiotática em macrófagos, aumentando

assim o número desses leucócitos no microambiente tumoral, amplificando, por sua vez, o efeito angiogênico dessas células (Barleon *et al.*, 1996; Leek *et al.*, 2000). A capacidade migratória e metastática das células tumorais é também modelada por TAMs: essas células liberam no microambiente enzimas específicas, as metaloproteases (MMP-2 e MMP-9), as quais degradam a matriz extracelular e membrana basal, evento chave do processo de migração celular (Pollard., 2004). Ainda, TAMs induzem a proliferação das células transformadas, liberando fatores de crescimento diversos que estimulam a divisão mitótica das células tumorais (O'Sullivan *et al.*, 1993; Ogmundsdottir *et al.*, 1995; Leek *et al.*, 2000; Leek & Harris, 2002).

Esse papel trófico de macrófagos na massa tumoral, amplamente descrito na literatura, contribui para a mudança do paradigma de que macrófagos intra-tumorais são recrutados para a eliminação das células transformadas. Hoje é crescente a idéia de que tumores são microambientes imunossupressores, resultado de processos seletivos darwinianos, os quais foram denominados de “*immunoediting*”. O perfil de expressão de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas nesse microambiente é essencial na determinação do fenótipo desses fagócitos. A exposição de macrófagos ou outras células de origem monocítica, como as células dendríticas, à forma membranar de CSF-1, por exemplo, parece estar associada ao intuitivo papel tumoricida de macrófagos. De outro lado, se monócitos/macrófagos são expostos à forma solúvel de CSF-1, macrófagos de função trófica e que promovem a progressão tumoral são gerados no microambiente tumoral (Jadus *et al.*, 1998). Esta última situação parece prevalecer em tumores humanos, uma vez que a presença de CSF-1 é associada a mau prognóstico (Toy *et al.*, 2001; Pollard, 2004).

Neutrófilos e câncer: efeito pró versus anti-tumoral.

O papel de neutrófilos na progressão de tumores ainda é um tanto quanto controverso (Lu *et al.*, 2006). Muitos grupos mostram um efeito anti-tumoral desses polimorfonucleares em diferentes modelos experimentais; por outro lado, existem evidências de que esses leucócitos promovem a progressão de tumores, por muitas vezes estimulando a angiogênese (Wislez *et al.*, 2003; Tazawa *et al.*, 2003; deLarco *et al.*, 2004; Alvarez *et al.*, 2005; Vosseler *et al.*, 2005; Zivkovic *et al.*, 2007). Em 1996, Szucs e colaboradores observaram ao longo da progressão de nefroma de ratos uma diminuição na produção de ânion superóxido e capacidade fagocitária em polimorfonucleares retirados do plasma, sugerindo haver uma interação entre esses leucócitos e células malignas. Essa interação também foi descrita em um trabalho de 2002 (Jablonska *et al.*), no qual os autores verificaram um aumento na produção de VEGF por neutrófilos induzidos por células de tumor de boca. Em melanoma, foi demonstrado que um infiltrado massivo de neutrófilos inibe o crescimento desse tumor, ao passo que quantidades menores desses polimorfonucleares na massa tumoral estimulam o crescimento dessa neoplasia (Schaidler *et al.*, 2003). De qualquer forma, acredita-se que esse papel dual de neutrófilos na progressão de tumores é resultado do perfil de citocinas e quimiocinas presentes no microambiente tumoral.

Outros tipos de células da imunidade inata envolvidas com a progressão de tumores.

A participação de outros tipos celulares derivados da linhagem mielóide como os mastócitos, por exemplo, também é o foco de estudo de muitos grupos que exploram a função dessas células no crescimento de tumores. Assim como relatado em relação aos

TAMs e até mesmo neutrófilos, alguns grupos comprovaram o envolvimento de mastócitos na indução do processo de angiogênese, invasão e metástase (Meininger & Zetter, 1992; Qu *et al.*, 1995; Ribatti *et al.*, 2001; Hiromatsu & Toda., 2003; Lin & Pollard, 2004). Ainda, é crescente o número de evidências que revelam o envolvimento de células supressoras mielóides Gr1⁺CD11b⁺ na progressão de tumores, estimulando angiogênese (Yang *et al.*, 2004) ou aumentando a sobrevivência e proliferação das células tumorais (Bunt *et al.*, 2006).

Independente do tipo celular, as células inflamatórias mielóides são recrutadas para a massa tumoral em resposta ao perfil de citocinas e quimiocinas produzidas tanto pelas células malignas como estromais. Na realidade, o microambiente tumoral em muito se assemelha ao tecido granulomatoso formado durante o processo de inflamação e cicatrização (*wound healing*), seguido de reparo tecidual, o que levou Hal Dvorak, em 1986, a definir tumores como lesões que não cicatrizam (“*a wound that never heals*”), i.e., tecidos em constante regeneração.

Angiogênese tumoral como resultado das interações entre os diferentes tipos celulares do microambiente.

As inter-relações entre elementos do estroma e células tumorais conferem não só vantagens no crescimento (proliferação) das células tumorais, como também promovem a formação de novos vasos sanguíneos a partir de vasos pré-existentes, processo denominado angiogênese- condição *sine qua non* para o crescimento de tumores (Folkman, 1972). A anatomia vascular tumoral é diferente daquela observada em tecidos “normais”: os vasos sanguíneos formados em tumores são tortuosos, possuem regiões

dilatadas, integridade vascular reduzida, numerosas fenestras e membrana basal descontínua ou ausente (Carmeliet & Jain, 2000; Hashizume *et al.*, 2000).

A angiogênese pode ser regulada tanto por indutores, como por inibidores dos processos de proliferação e migração da célula endotelial, e da formação de túbulos (Folkman & Hanahan, 1991; Iruela-Arispe & Dvorak, 1997). Embora o perfil de expressão de fatores angiogênicos possa variar de acordo com o microambiente tecidual em questão, o balanço entre os fatores indutores e inibidores desse processo é que determina se as células endoteliais permanecem quiescentes ou em proliferação (Bergers *et al.*, 1998). Doenças relacionadas à produção excessiva de novos vasos sanguíneos como o câncer, por exemplo, são decorrentes de um aumento na produção de moléculas pró- angiogênicas e diminuição de inibidores desse processo no microambiente tumoral. Esse desbalanço é resultado de alterações nas inter-relações entre fatores genéticos e ambientais, de mutações genéticas, metabólicas, estresse mecânico e mecanismos inflamatórios (Bergers & Benjamin, 2003).

Inúmeras evidências indicam que a angiogênese promove não só o crescimento de tumores, mas também a progressão de um fenótipo pré- maligno para maligno e/ou invasivo (Mueller & Fusenig, 2004). Muitos estudos em tumores humanos e em modelos animais mostram que a indução da angiogênese pode ocorrer em diferentes estágios da progressão de tumores, dependendo da natureza da neoplasia e do microambiente tumoral. Historicamente, a angiogênese tumoral foi descrita como um processo que ocorre em 2 etapas separadas pelo que se chamou de “*switch*” angiogênico. A primeira etapa é definida como a fase avascular, na qual os tumores permanecem como lesões ocultas de tamanho limitado (diâmetros de 1 a 2 mm). Esses tumores são ditos dormentes e caracterizados pelo balanço preciso entre proliferação e morte celular. A

segunda fase, fase vascular, é caracterizada pelo crescimento em exponencial da massa tumoral (Folkman, 1995; Bergers & Benjamin, 2003).

O uso de camundongos transgênicos nos quais a progressão de tumores pôde ser dividida em diferentes etapas foi indubitavelmente essencial na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no “*switch*” angiogênico. Hoje já se sabe que a indução da angiogênese em tumores é um evento “discreto” que pode ocorrer a partir dos estágios iniciais da tumorigênese, como em lesões pré-neoplásicas, que precedem o aparecimento de massas sólidas palpáveis, sendo, assim, uma etapa limitante para progressão de tumores (Hanahan & Folkman, 1996).

A observação de que tumores implantados em regiões avasculares como a córnea, por exemplo, induzem a formação de capilares que entremeiam a massa tumoral levou os pesquisadores a especular sobre a existência de fatores solúveis secretados pela célula tumoral que estimulam tal processo (Cockerill *et al.*, 1995). A busca por fatores pró-angiogênicos foi então implementada e hoje já foram caracterizados diversos desses. O primeiro fator pró-angiogênico descoberto foi o fator de crescimento básico (bFGF ou FGF-2) e, logo em seguida, FGF-1 (ou FGF ácido). Ambas proteínas são membros de uma família de fatores de crescimento caracterizadas por apresentarem alta afinidade a heparina (Kandel *et al.*, 1991; Friesel & MacIag, 1995; Christofori, 1996). Concomitantemente, uma outra proteína foi identificada pela sua habilidade em aumentar a permeabilidade vascular, sendo denominada de fator de permeabilidade vascular ou fator de crescimento de endotélio vascular (VPF/VEGF; Senger *et al.*, 1993). Pouco tempo depois, foi demonstrado que VEGF é um potente indutor do processo de angiogênese (Jakeman, 1993; Inoue *et al.*, 2002). VEGF é uma glicoproteína homodimérica de 45 kDa sintetizada por células “normais” e neoplásicas

que exerce suas ações biológicas através da ligação com seus receptores tirosina quinase VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (Flk-1/KDR) e VEGFR-3 (Flt-4) que são expressos por células endoteliais e mononucleares (Byrne *et al.*, 2005; Salnikov *et al.*, 2006). A família gênica de VEGF compreende 6 diferentes genes: VEGF-A (VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E e PLGF (fator de crescimento de placenta). Essas glicoproteínas pertencem a uma família de fatores de crescimento estruturalmente relacionada que inclui PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta). Existem pelo menos 5 isoformas do gene de VEGF-A em humanos que se distinguem entre si pela afinidade de ligação a heparina. VEGF (VEGF-A) está principalmente relacionado à angiogênese, ao passo que VEGF-C e VEGF-D, à linfangiogênese (Cross & Claesson-Welsh, 2001; Byrne *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2006).

VEGF é um fator de crescimento de ação pleiotrópica. Além de estimular a proliferação de células endoteliais (Pages *et al.*, 2000), VEGF medeia a sobrevivência das mesmas, induzindo sinais anti-apoptóticos (Alon *et al.*, 1995; Harmey *et al.*, 2002), medeia a secreção e ativação do ativador de plasminogênio (Mandriota *et al.*, 1995; Pepper, 2001; Bajou *et al.*, 2004; Prager *et al.*, 2004) e de outras metaloproteases de matriz envolvidas na degradação e remodelamento da matriz extracelular (Bergers *et al.*, 2000; Lynch & Matrisian, 2002), evento essencial na migração e estabelecimento de metastáse (Belotti *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2006). Recentemente, foi demonstrado que o papel de VEGF não está restrito somente ao processo angiogênico. Evidências mostram que a expressão do receptor VEGFR1 é um importante marcador de sítio metastático: Kaplan e colaboradores (2005) observaram que grupos de células derivadas da medula óssea expressam VEGFR1 em sítios metastáticos antes mesmo da chegada de células tumorais nesses sítios, favorecendo, de algum modo ainda não elucidado, o crescimento

dos clones metastáticos. Ainda, em 2004, Shan e colaboradores mostraram que VEGF, dentre outros fatores angiogênicos, modulam positivamente a sobrevivência da célula tumoral.

Ao longo das últimas décadas, diversos outros fatores pró-angiogênicos foram identificados e caracterizados, como o fator de crescimento transformante β , (TGF β), angiopoietinas, fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e diversas citocinas como interleucina-1 e -6, além de quimiocinas como IL-8 (Muller *et al.*, 1987; Folkman & Klagsburn, 1987; Roberts *et al.*, 1989; Pepper *et al.*, 1990; Bussolino *et al.*, 1992; Meininger & Zetter, 1992; Grant *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1995; Witzanbichler *et al.*, 1998; Salgado *et al.*, 1999; Valter *et al.*, 1999; Wei *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2002, Ding *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Loeffler *et al.*, 2005; Neufeld & Kessler, 2006; Strieter *et al.*, 2006).

Dentre os inibidores angiogênicos, destacam-se angiostatina, trombospondina, endostatina e tumstatina (Good *et al.*, 1990; O'Reilly *et al.*, 1994; Gately *et al.*, 1996; DiPietro *et al.*, 1993a O'Reilly *et al.*, 1997; Folkman, 2006). É interessante ressaltar que moléculas como angiostatina, endostatina e tumstatina são de fato produtos da proteólise limitada de moléculas como plasminogênio, colágeno XVIII e colágeno IV, respectivamente. A geração destes fatores depende da produção de enzimas proteolíticas, como as metaloelastases, produzidas por macrófagos (Dong *et al.*, 1997; Mueller & Fusenig, 2004). Curiosamente, estes angiostáticos não atuam no tumor primário, apesar de bloquearem o crescimento de metástases; o que sugere que eles sejam inativados no tumor primário (O'Reilly *et al.*, 1994; 1997)

Hanahan e Folkman (1986), baseados em evidências de que a angiogênese é regulada por fatores indutores e inibidores desse processo, postularam que o *switch* angiogênico observado em tumores é resultante de alterações no balanço entre fatores pró e anti-angiogênicos, de modo que um excesso de fatores pró sobre os anti-angiogênicos induz tal processo, como ilustrado no esquema a seguir adaptado de Hanahan e Folkman (1996):

Muitos grupos contribuíram para a compreensão dos mecanismos que controlam o *switch* angiogênico em tumores. Em 2000, Rak e colaboradores escreveram sobre a ação angiogênica de alguns oncogenes como Ras, Src e HER-2. Esses oncogenes, dentre outros, controlam positivamente a expressão de proteínas pró-angiogênicas como VEGF, bFGF, IL-8, PLGF, TGF- β , PDGF, pleiotrofinas, dentre muitas outras (Relf *et al.*, 1997; Fukumura *et al.*, 1998; Rak *et al.*, 2000; Rak & Yu, 2004), promovendo, então, a formação de uma rede de vasos intratumoral. A deprivação de oxigênio em algumas áreas (hipóxia) dos tumores leva a ativação do fator induzível por hipóxia 1 α (HIF-1 α)

que promove um aumento na expressão de inúmeros fatores pró-angiogênicos (Carmeliet *et al.*, 1998; Shi & Fang, 2004; Pouyssegur *et al.*, 2006). A diminuição na expressão de genes codificadores de proteínas anti-angiogênicas como trombospondina, por exemplo, também está envolvida na regulação do *switch* angiogênico (Dameron *et al.*, 1994). Em adição, células não transformadas do microambiente tumoral estão envolvidas no controle desse mecanismo. Fibroblastos constituem uma importante fonte de fatores angiogênicos (Fukumura *et al.*, 1998, Kalluri & Zeisberg, 2006), assim como células hematopoiéticas. Em relação à participação dessas células na angiogênese tumoral, acredita-se que parte dos fatores que recrutam células da medula óssea para as lesões pré-malignas são os mesmos que induzem a ativação do estroma e da angiogênese nas fases iniciais do reparo tecidual em resposta a uma injúria. Uma vez no sítio tumoral, essas células tornam-se importante secretoras de fatores pró-angiogênicos como VEGF, IL-8, dentre outros, além de metaloproteases (Shi *et al.*, 1998; Okamoto *et al.*, 2005; revisado em De Palma & Naldini, 2006). Dentre as células de origem hematopoiética mais estudadas no processo de angiogênese tumoral estão os macrófagos. A importância desses fagócitos na promoção da angiogênese tumoral foi relatada em estudos que mostram que macrófagos presentes no microambiente tumoral (infiltrado inflamatório) modulam positivamente a formação de novos vasos através da síntese e secreção de bFGF, VEGF, fator de necrose tumoral (TNF- α), entre outras quimiocinas importantes na angiogênese (Polverini *et al.*, 1989; DiPietro & Polverini, 1993b; Kerbel, 2000) e enzimas proteolíticas, que não só atuam na remodelação da matriz extracelular, como também alteram a biodisponibilidade ou estado de ativação de muitos dos fatores mencionados acima (Coussens & Werb, 2002).

Lectinas, galectinas e galectina-3

Com o avanço da análise proteômica, a importância biológica das modificações pós-traducionais de proteínas (como a glicosilação, por exemplo) e sua função na regulação da atividade das mesmas tornou-se evidente. Em decorrência, “surgiu” a glicômica (*glycomics*) e com essa nova vertente o mundo científico se defrontou com uma mudança no paradigma a respeito da função biológica das moléculas de carboidratos, as quais, então, passaram a ser contempladas como um grande reservatório de informações biológicas (*The Sugar Code*) complementar ao código genético (nucleotídeos e aminoácidos). De fato, a capacidade codificadora de carboidratos é muito maior que a de nucleotídeos e aminoácidos. Assim, dentro desse cenário, os carboidratos tornaram-se moléculas interessantes e atraentes no estudo e na compreensão de diferentes processos biológicos (Gabijs, 2000; Gabijs *et al.*, 2004).

A tradução da informação biológica armazenada nas diversas moléculas de glicanos são traduzidas por proteínas específicas denominadas lectinas. Diferentes processos biológicos dependem da interação fisiológica entre lectinas e carboidratos, tais como o reconhecimento de patógenos por células do sistema imune inato, as interações célula-célula e célula-matriz extracelular e os processo de migração e proliferação celular (Gabijs & Wu, 2006). As lectinas são, então, proteínas que se ligam a carboidratos e que podem reconhecer diferentes moléculas de carboidratos ligadas a proteínas e lipídeos, nomeados glicoconjugados, na superfície celular e/ou matriz extracelular. Essas proteínas foram classificadas em pelo menos 4 grupos: lectinas do tipo C, tipo P, tipo I e do tipo S (ou S-Lac), onde se encontram as galectinas (Rini & Lobsanov, 1999; Krzeslak & Lipinska, 2004; Liu & Rabinovich, 2005).

As galectinas foram descobertas graças à hipótese de que carboidratos presentes na superfície celular estariam envolvidos no processo de adesão celular (revisado em Leffler *et al.*, 2004), o que ressalta a importância das informações biológicas existentes nas moléculas de açúcar. Galectinas constituem uma família de lectinas animais evolutivamente conservadas que exibem similaridade no domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD- *C*arbohydrate *R*ecognition *D*omain) e afinidade por glicoconjugados ricos em N-acetil-lactosamina (revisado em Rabinovich, 1999). Essas proteínas são formadas por uma única cadeia polipeptídica contendo 1 ou 2 CRDs. Em 1993, Hirabayashi e Kasai classificaram essas proteínas em 3 tipos, de acordo com a arquitetura das mesmas: proto (galectinas-1, -2, -5 e -7), químera (galectina-3) e tandem (galectinas -4, -6, -8 e -9). As galectinas do tipo proto são homodímeros formados por dois CRDs idênticos não covalentemente ligados; por outro lado, as galectinas do tipo tandem são proteínas formadas por 2 CRDs distintos. Finalmente, o tipo químera tem como único representante galectina-3 que apresenta estrutura peculiar composta pelo domínio CRD na sua porção C-terminal, por uma sequência colágeno-símile rica em glicina, prolina e tirosina, e pela extremidade N-terminal (Barondes *et al.*, 1994).

Com relação a aspectos funcionais dessas proteínas, estudos sobre a expressão e acúmulo de galectinas revelaram 3 importantes aspectos brevemente descritos a seguir: (1) diferentes organismos expressam múltiplos membros da família das galectinas, (2) diferentes células de um organismo expressam mais de um tipo de galectina e (3) quase todas as células acumulam pelo menos 1 tipo de galectina (Liu *et al.*, 2002). As galectinas encontram-se tanto no meio extracelular (matriz extracelular e superfície celular) como intracelular (citoplasma e núcleo). As funções extracelulares dessas lectinas foram descritas a partir de estudos cujo desenho experimental incluía a adição

exógena das mesmas, ao passo que suas funções intracelulares foram clarificadas através do controle gênico extrínseco em células transfectadas com os genes codificadores de tais proteínas. (Hsu & Liu, 2004). Vale mencionar que galectinas não possuem sequência sinal utilizada na via secretória clássica; contudo, alguns membros dessa família são secretados por alguns tipos celulares que as expressam provavelmente por uma via secretória alternativa, sendo assim encontradas na matriz extracelular (Cooper & Barondes, 1990; Hughs, 1999).

Essas proteínas foram re-descobertas em muitas outras espécies animais e em diferentes contextos, recebendo assim diferentes nomes. Felizmente, a comunidade científica chegou a um consenso e a nomenclatura de galectina-3 passou a ser usada para designar a mesma lectina descrita em tecidos humanos, de rato, cão e murino como até então nomeadas Mac-2, ϵ BP, CBP-35, CBP-30, L29, dentre outros nomes. Quanto a nomenclatura utilizada na identificação dos genes codificadores de galectinas, designa-se LGALS (*lectin, galactoside-binding, soluble*) e a numeração é a mesma usada na designação da proteína (i.e., LGALS3 corresponde ao gene codificador de galectina-3) (Barondes *et al.*, 1994).

Com relação à estrutura molecular funcional dessas proteínas, algumas galectinas são denominadas bivalentes ou multivalentes: galectinas compostas por 1 único CRD podem formar dímeros e, conseqüentemente, essa nova estrutura liga-se a duas moléculas de carboidratos (por terem 2 CRDs); já galectina-3, por exemplo, forma oligômeros quando se liga a múltiplos carboidratos (Ahmad *et al.*, 2004), constituindo desse modo estruturas supramoleculares conhecidas como *lattices* (Rini & Lobsanov, 1999; Brewer *et al.*, 2002; Hirabayashi *et al.*, 2002).

Dentre as galectinas mais estudadas destacam-se as galectinas-1 e -3. Evidências experimentais mostraram a participação dessas lectinas em importantes processos biológicos tais como adesão celular, proliferação, morte, embriogênese, inflamação, transformação maligna e subseqüentes etapas do processo de progressão tumoral. O envolvimento dessas proteínas nessa gama de processos biológicos, além de intrigante, instiga a exploração funcional dessas lectinas em diversos modelos biológicos.

Galectina-3 é provavelmente o membro mais estudado da família de galectinas (Ochieng *et al.*, 2004). Essa proteína, de peso molecular de 31kDa, é encontrada em solução como um monômero com 2 domínios funcionais: o domínio N-terminal, de 100 a 150 aminoácidos dependendo da espécie, formado por seqüências repetidas ricas nos aminoácidos prolina, glicina, tirosina e glutamina sem a presença de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos. Ainda, esse domínio possui 2 sítios de fosforilação em resíduos de serina, Ser6 e Ser 12, essenciais na modulação de diferentes fenômenos biológicos comentados adiante. A extremidade C terminal de galectina-3 é a que contém o domínio de reconhecimento a carboidratos, CRD, composto por cerca de 135 aminoácidos que define sua identidade de galectina. Ambas extremidades estão envolvidas na formação de dímeros ou oligômeros de galectina-3, cuja implicação funcional será abordada a seguir (Hsu *et al.*, 1992; Barondes *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1996). Em 1998, Yang e colaboradores mostraram que, na ausência de ligantes (i.e, sacarídeos), moléculas de galectina-3 também se associam via domínio carboxi-terminal. Nesse caso, os autores propõem que essa associação ocorra intracelularmente e esteja relacionada às funções intracelulares dessa lectina, tais como sua participação nos processos de crescimento e morte celular (Yang *et al.*, 1996).

A estrutura do gene de galectina-3 é refletida na organização molecular de multidomínios da proteína. O gene de galectina-3 é composto por 6 exons e 5 íntrons, sendo que o exon I é composto em sua maior parte pela sequência não traduzida do RNA mensageiro (RNAm). O exon II contém a parte final dessa sequência 5' não traduzida do RNAm, o sítio de iniciação da tradução e os 5 primeiros aminoácidos da proteína. O exon III codifica a sequência repetitiva da região amino-terminal e, finalmente, os exons IV, V e VI codificam a extremidade carboxi-terminal de galectina-3 (Krzeslak & Lipinka, 2004).

Assim como as demais galectinas, a expressão de galectina-3 é finamente regulada durante o processo de embriogênese, de acordo com o estágio de desenvolvimento do embrião (Poirier *et al.*, 1992). Em adição, a expressão e distribuição sub-celular são moduladas por diferentes estímulos como infecções virais (Hsu *et al.*, 1996), genes supressores tumorais (Gaudin *et al.*, 1997), e por agentes inflamatórios (Sato & Hughes, 1994).

As atividades biológicas de galectina-3 na superfície celular e no compartimento extracelular (matriz extracelular) envolvem primordialmente suas interações com vários glicanos através do CRD. Galectina-3, como os demais membros da família, é definida por ser uma proteína ligadora de β -galactosídeos. A adição de 1 resíduo de glicose a extremidade redutora de galactose (lactose) aumenta consideravelmente a afinidade de galectina-3. Interessantemente, Barboni e colaboradores (1999) demonstraram que outras regiões da proteína como a sequência símile a colágeno, por exemplo, podem influenciar na reatividade do CRD a vários glicanos, aumentando ou diminuindo a afinidade de galectina-3 pelos mesmos, mostrando a versatilidade dessa molécula.

Muitos trabalhos relatam o envolvimento de galectina-3 em diferentes patologias, como na resposta inflamatória a agentes infecciosos, na vascularização exarcebada decorrente de diabetes e também nos diferentes aspectos que compreendem a transformação maligna e progressão de tumores, tema esse abordado no presente estudo.

Galectina-3 e câncer.

Algumas células tumorais acumulam grandes quantidades de galectina-3, como por exemplo, tumores gástricos e hepatocarcinomas; por outro lado, galectina-3 não é universalmente associada à progressão tumoral, sendo sua expressão diminuída em tumores de mama, cólon e pele, por exemplo. Estudos em nosso laboratório mostram que em linhagens de melanoma há diminuição da expressão de galectina-3 ao longo da progressão tumoral, a qual parece estar associada à via de transformação maligna seguida pela célula. Por exemplo, células que apresentam mutações no gene supressor de tumor *TP53* tendem a acumular galectina-3. Como esta é uma alteração tardia observada na maior parte dos tumores, é possível que a expressão de galectina-3 desempenhe algum papel em estágios tardios da progressão tumoral, favorecendo a quimiorresistência e o desenvolvimento de metástases (Califice *et al.*, 2004; Grassadonia *et al.*, 2004; Takenaka *et al.*, 2004; van den Brule *et al.*, 2004).

O processo de transformação maligna compreende alterações no genoma das células que conferem vantagens no crescimento (proliferação), na sobrevivência, na capacidade das mesmas em metastatizar à distância e de escapar da vigilância do sistema imune (Hanahan & Weinberg, 2000). Sob esse aspecto, é crescente o número de trabalhos que demonstram o envolvimento de galectina-3, direta ou indiretamente, nas diferentes etapas do processo de transformação maligna e progressão tumoral. Com

relação às etapas iniciais do processo de transformação maligna, alguns poucos estudos *in vitro* mostram evidências de que galectina-3 é necessária para a aquisição do fenótipo maligno por certos tipos celulares. Em células epiteliais da glândula tiróide, por exemplo, galectina-3 é essencial para o crescimento independente de ancoragem, fenótipo esse característico das etapas iniciais da transformação maligna (Yoshii *et al.*, 2001; Takenaka *et al.*, 2003). Algum *insight* mecanístico sobre a ação de galectina-3 nesse processo foi demonstrado por Mazurek e co-autores (2005) em células epiteliais de mama. Nesse trabalho, os autores observaram que galectina-3 induz a expressão de uma série de genes relacionados a processos celulares alterados em neoplasias, tais como os processos de morte, adesão, proliferação e invasão celular, e que essa ação biológica é dependente da fosforilação de galectina-3 no resíduo de Serina 6 pela caseína quinase. Dentro desse contexto mecanístico, em 2004 Elad-Sfadia e colaboradores já haviam mostrado a interação entre galectina-3 e o oncogene KRAS e, como resultado dessa interação, a ativação de RAF1 e de PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase), efetores de vias de sinalização que regulam a proliferação celular, cuja ativação constitutiva contribui para aquisição do fenótipo maligno. Entretanto, muito pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação dessa lectina na transformação celular.

Alterações moleculares envolvidas no processo de morte celular são indiscutivelmente cruciais para a progressão de tumores, na medida em que tais alterações diminuem a sensibilidade dessas células a diferentes estímulos nocivos, dentre os quais destacam-se os quimioterápicos, particularmente conhecidos por induzirem apoptose, na maioria dos casos, em diferentes tipos de tumores. Parte dessas alterações que confere maior resistência à morte em células tumorais é decorrente de uma série de modificações em vias bioquímicas que culminam no processo de apoptose (Hanahan &

Weinberg, 2000; Gatti & Zunino, 2005). Dentre as inúmeras funções de galectina-3 relacionadas à progressão de tumores, seu envolvimento no processo de morte por apoptose é o aspecto mais explorado por diferentes grupos de pesquisa (Liu e Rabinovich, 2005). Surpreendente é o fato de que essa proteína pode atuar como uma molécula anti- ou pró-apoptótica, o que depende da sua localização celular. De um modo geral, quando no citoplasma, galectina-3 atua como uma molécula anti-apoptótica (Califice *et al.*, 2004; Domic *et al.*, 2006). Muitos trabalhos demonstraram a atividade anti-apoptótica de galectina-3 em resposta a diferentes estímulos de morte, incluindo agentes quimioterápicos, em uma série de tumores (Akahani *et al.*, 1997; Lin *et al.*, 2000; Takenaka *et al.*, 2004; Califice *et al.*, 2004; Choi *et al.*, 2004; Hoyer *et al.*, 2004; Oka *et al.*, 2005; Fukumori *et al.*, 2006). Embora tal mecanismo de ação de galectina-3 na apoptose ainda não seja totalmente compreendido, existem evidências de que essa lectina transloca-se para a mitocôndria em resposta a um estímulo apoptótico (Yu *et al.*, 2002), bloqueando alterações no potencial transmembrânico mitocondrial, impedindo, assim, a morte das células (Mataresse *et al.*, 2000). Em adição, alguns trabalhos mostram que tal ação anti-apoptótica de galectina-3 é dependente do domínio NWGR (domínio de homologia a Bcl-2 1) (Yu *et al.*, 2002) e da fosforilação no resíduo de serina na posição 6 (Ser6) (Yoshii *et al.*, 2002), ambos sítios localizados na porção amino-terminal da molécula. Por outro lado, existem evidências de que galectina-3 induz apoptose via CD95 em linhagem celular de linfoblastoma humano (Fukumori *et al.*, 2004) e aumenta a sensibilidade à morte e a emigração de timócitos do timo de animais infectados com *Trypanossoma cruzi* (Silva-Monteiro *et al.*, 2007).

Galectina-3 também participa dos processos de proliferação e sobrevivência celular, processos esses que se encontram alterados em tumores, conferindo aos mesmos

vantagem adaptativa significativa frente a estímulos anti-proliferativos, garantindo, assim, o crescimento contínuo e a sobrevivência das células malignas na corrente sanguínea e em outros tecidos que não o de origem. A proliferação de certos tipos de células é acompanhada por um aumento ou inibição da expressão do gene de galectina-3. Em adição, galectina-3 endógena ou exógena pode induzir ou inibir o crescimento celular (Dumic *et al.*, 2006). A ação proliferativa dessa lectina já foi descrita nos mais diferentes tipos de células não transformadas como em fibroblastos humanos (Inohara *et al.*, 1998). Em células malignas, galectina-3 pode promover a proliferação como o observado em células Jurkat (linfoma de células T) (Yang *et al.*, 1996), células de carcinoma de mama humano (Honjo *et al.*, 2001), e em células de carcinoma papilar de tiróide humana (Yoshii *et al.*, 2001). Por outro lado, Ellerhorst e colaboradores (2002) demonstraram que a ação proliferativa dessa lectina depende de sua localização subcelular de modo que, quando presente no citoplasma de células de câncer de próstata, galectina-3 induz a proliferação dessas células e, quando no núcleo, inibe. Questionamentos a respeito do mecanismo de ação envolvido na regulação do crescimento celular por galectina-3 logo suscitaram e, na realidade, pouco se sabe sobre a possível interação entre galectina-3 e vias de sinalização que “governam” a proliferação celular. Shalom-Feuerstein e colaboradores (2005) confirmaram o envolvimento da via de sinalização mediada por Ras-MEK-ERK e proliferação induzida por galectina-3. Outros grupos mostraram que a ação proliferativa de galectina-3 envolve a ativação de fatores de transcrição como TTF1 (Paron *et al.*, 2003), do complexo transcricional dependente de fator celular T (Tcf) (Shimura *et al.*, 2004) e até mesmo a ativação de enzimas quinases como Akt (Lee *et al.*, 2003; Oka *et al.*, 2005), o que parece depender do tipo celular.

Ao longo da progressão tumoral, as células malignas adquirem alterações outras que promovem o estabelecimento de focos metastáticos à distância – principal causa de morte de pacientes com câncer. O processo de metástase é dependente de interações entre célula-célula e célula-matriz extracelular (MEC), além de diferentes etapas essenciais para a disseminação do tumor, tais como: (1) crescimento da massa tumoral no sítio primário; (2) formação de novos vasos no tumor (angiogênese); (3) desalojamento de células tumorais do sítio primário; (4) invasão do tecido subjacente; (5) disseminação das células tumorais pela corrente sanguínea ou linfática; (6) formação de êmbolos tumorais nos capilares; (7) extravasamento das células malignas; e (8) crescimento nos sítios secundários (Melo *et al.*, 2003). Nesse contexto, vários são os trabalhos que relatam o envolvimento de galectina-3 nas diferentes etapas acima descritas que compreendem a cascata metastática e que correlacionam a expressão de galectina-3 em células tumorais e o potencial metastático desses tumores (Takenaka *et al.*, 2004). Galectina-3 exógena, por exemplo, inibe a adesão de células tumorais a proteínas da matriz extracelular, promovendo assim o desalojamento e a disseminação dessas células (revisado em Hughes, 2001; Kuwabara *et al.*, 2003; Ochieng *et al.*, 2004). Em relação ao processo migratório em si, existem evidências de que galectina-3 possa atuar ora como uma molécula pró- migratória, como observado em células de carcinoma de mama (Le Marer *et al.*, 1996), de pulmão (O'Driscoll *et al.*, 2002) e em sarcomas (tese de doutoramento de Fabiana Henriques Machado de Melo, 2006), ora como uma molécula inibidora de tal processo como em carcinoma de cólon (Hittelet *et al.*, 2003) e em glioblastoma (Debray *et al.*, 2004). Essa ação antagônica de galectina-3 ainda não é totalmente compreendida; entretanto, especula-se que a ação migratória dessa lectina

seja dependente de diferentes moléculas de superfície, como a superfamília de integrinas, por exemplo, que sabidamente variam de acordo com o tipo celular.

Finalizando as evidências da participação de galectina-3 em diferentes etapas da cascata metastática, essa lectina parece ser crucial para a disseminação das células malignas. Em câncer de mama e de próstata, por exemplo, a interação heterotípica entre célula tumoral e endotelial, assim como a interação homotípica entre células tumorais, ambas mediadas por galectina-3, são essenciais para a sobrevivência das células tumorais na corrente sanguínea e para o estabelecimento de metástase em órgãos específicos (Glinsky *et al.*, 2003; Zou *et al.*, 2005).

Os processos de invasão e de metástase são dependentes de vasos sanguíneos. Em tumores, esses vasos são formados a partir de vasos pré-existentes num processo denominado angiogênese, como descrito anteriormente. Quanto à participação de galectina 3 no processo angiogênico, é crescente o número de evidências da existência de um novo grupo de reguladores angiogênicos composto pelas proteínas ligantes de carboidratos. Primeiramente relatou-se a participação dessas proteínas no crescimento de tumores e metástase, e, mais recentemente, alguns estudos apontam para um possível papel dessas proteínas na regulação do processo de angiogênese. Nangia-Makker e colaboradores (2000) demonstraram a participação de galectina-3 na formação de túbulos capilares *in vitro* e na angiogênese *in vivo*, sugerindo que essa lectina atue como um fator pró-angiogênico. Por outro lado, há controvérsias na literatura de que galectina 3 realmente seja um indutor de angiogênese em gliomas (revisado em Strike *et al.*, 2001); entretanto, alguns trabalhos em outros tipos tumorais apontam para uma correlação positiva entre expressão de galectina 3 e metástase à distância (Gordower *et al.*, 1999; Riss *et al.*, 2003). O fato de que a galectina-3 atue na quimiotaxia de

macrófagos e que essas células, por sua vez, são potentes secretoras de fatores pró-angiogênicos sugerem uma participação, mesmo que indireta, de galectina 3 na formação de novos vasos.

Galectina-3: importante molécula moduladora do processo inflamatório. Uma possível correlação com a progressão de tumores?

Durante a última década, muitas lectinas foram descritas como importantes moduladores de processos inflamatórios. Tal função foi evidenciada nos anos 80 com a identificação da participação de selectinas (lectinas dependentes de Ca^{2+}) e seus ligantes (oligosacarídeos) como mediadores do tráfego leucocitário em direção a tecidos com injúrias. Recentemente, muitos imunologistas atribuíram às galectinas importante função na regulação da homeostase de células imunes. Essas proteínas são amplamente expressas nos órgãos linfóides primários e secundários e em células inflamatórias como macrófagos, monócitos, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos (revisado em Rabinovich *et al.*, 2002). Ainda, galectinas-1 e -3, os membros mais estudados dessa família, também são expressas por células estromais do timo (Villa-Verde *et al.*, 2002) e por células T e B ativadas (Joo *et al.*, 2001; Acosta-Rodrigues *et al.*, 2004). Interessantemente, a expressão dessas lectinas é regulada de acordo com o estado de ativação dessas células.

De fato, o papel de galectina-3 foi demonstrado em diferentes processos inflamatórios. Na resposta inflamatória aguda, em contraste à ação anti-inflamatória de galectina-1, galectina-3 é apontada como uma potente molécula pró-inflamatória, sendo capaz de ativar NADPH oxidase (Karlsson *et al.*, 1998), estimular a produção de ânion superóxido em neutrófilos (Yamaoka *et al.*, 1995), e potencializar a produção de IL-1 induzida por LPS (lipopolissacarídeo) (Jeng *et al.*, 1994). Nas repostas imunes mediadas

por células T, galectina-3 inibe especificamente a transcrição gênica de IL-5, em linhagens de linfócitos T associadas a processos alérgicos, sugerindo que essa proteína seja um inibidor de reações alérgicas e, nesse caso, atue como uma molécula anti-inflamatória (Cortegano *et al.*, 1998). Ainda em relação a essas células, Demetriou e colaboradores mostraram em 2001 que galectina-3 forma um *lattice* com o receptor de célula T e CD3 na superfície celular, modulando dessa forma a ativação dessas células. Em relação a mastócitos e basófilos, a ativação dessas células por galectina 3 mostrou-se dependente da interação entre essa lectina, IgE e seu receptor (Hughes, 1992).

O papel de galectina-3 em linfócitos T não se restringe somente a regulação funcional dessa célula. Essa lectina também participa do controle de crescimento e de morte programada (apoptose) dessas células (Yang *et al.*, 1996). Também foi demonstrado que galectina-3 é expressa por linfócitos T murinos ativados, sendo a expressão gênica nessas células modulada positivamente por interleucinas-2, -4 e -7, conferindo aumento da viabilidade e proliferação de linfócitos T (Joo *et al.*, 2001). Por outro lado, Fukumori e colaboradores (2003) mostraram que galectina-3 secretada induz apoptose através da interação com os receptores de superfície de linfócitos T CD29 e CD27, e que sua ação pró- ou anti-apoptótica é dependente da presença ou ausência dessa proteína no citoplasma dessas células.

Há trabalhos que relatam a participação de galectina-3 nas interações célula-célula e célula-matriz extracelular, eventos biológicos essenciais na resposta imune. Galectina-3, por exemplo, promove a adesão de neutrófilos a laminina (Kuwabara & Liu., 1996). A função dessa proteína na adesão de neutrófilos também foi evidenciada em infecções induzidas por *Escherichia coli*. Entretanto, ainda é incerto se leucócitos

circulantes secretam ou não galectina-3 para mediar a interação dessas células com a matriz-extracelular.

Em macrófagos, Sasaki e colaboradores (1999) sugerem, por exemplo, que durante a progressão de doenças inflamatórias renais há um aumento na expressão e secreção de galectina-3 pelos macrófagos infiltrantes, sendo esse processo importante na hiperplasia mesangial que ocorre nessa doença. Hsu e colaboradores (2000) elegantemente mostraram que o infiltrado inflamatório é menor no peritônio de camundongos nulizigotos para o gene de galectina-3 em resposta ao tratamento com tioglicolato. Esse infiltrado mais atenuado é decorrente da diminuição na quantidade de macrófagos na cavidade peritoneal, evidenciando o papel pró-inflamatório de galectina-3 e sua importância na biologia desses fagócitos. Posteriormente, Sano e colaboradores (2003) mostraram que em camundongos nulizigotos para o gene de galectina-3, a atividade fagocítica de macrófagos é reduzida, comprometendo o *clearance* de linfócitos apoptóticos e de microorganismos nesses animais. Os autores demonstraram também que esse efeito é decorrente de um mecanismo de ação intracelular de galectina-3, sugerindo que essa lectina seja importante na homeostase e funcionalidade de macrófagos. (Beatty *et al.*, 2002; Sano *et al.*, 2003), reforçando os achados de Hsu e colegas (2000).

Recentes evidências indicam que galectinas, em especial galectina-3, também atuam na quimiotaxia de células inflamatórias, constituindo então uma nova classe de quimiocinas. Em 2000, Sano e colaboradores mostraram que galectina-3 humana recombinante promove a quimiotaxia de monócitos humanos. Em adição, essa lectina recruta monócitos, eosinófilos e neutrófilos em modelo de bolsa de ar jugal em camundongos.

Frente a esses achados e aos inúmeros trabalhos que associam a progressão de tumores ao processo inflamatório crônico, nossa proposta foi investigar se galectina-3, que modula a resposta inflamatória frente a diferentes estímulos, favorece ou não o crescimento de melanoma murino.

OBJETIVO GERAL

Determinar o papel de galectina-3 na resposta angiogênica associada ao crescimento de melanoma murino em função do tipo celular que a expressa.

Objetivos específicos

1. Avaliar o acúmulo de galectina-3 nas frações citoplasmática e nuclear de células de melanoma murino Tm1 transfectadas com o gene de galectina-3.
2. Avaliar a curva de proliferação de células de melanoma Tm1 transfectadas ou não com o gene de galectina-3 *in vitro*.
3. Avaliar a sensibilidade das células Tm1 transfectadas ou não com o gene de galectina-3 ao estímulo de morte celular *in vitro*.
4. Avaliar a cinética de implantação de células de melanoma Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, no coxim plantar de camundongos selvagens C57BL/6, dando ênfase ao padrão de infiltrado celular imunorreativo ao anticorpo anti-galectina-3 e ao estabelecimento de uma massa celular imunorreativa ao anticorpo anti-PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular).
5. Avaliar o crescimento tumoral de células de melanoma Tm1 transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3.
6. Caracterizar o microambiente de tumores originados de células Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para essa lectina, quantificando a área necrótica e o número de células positivas para o anticorpo anti-galectina-3.

7. Avaliar a resposta angiogênica em tumores originados de células Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para essa lectina, quantificando a área vascular, o número de estruturas vasculares funcionais imunopositivas para o anticorpo anti-CD34 e a expressão de genes associados à angiogênese, como o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF).

METODOLOGIA

O presente projeto primeiramente intitulado “Análise de fatores microambientais na resposta angiogênica e inflamatória de tumores experimentais”, protocolo número 533/04, foi aprovado em 2004 pela CAPPesq, Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa, da diretoria clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

1. Manutenção de células em cultura.

Células de melanoma murino Tm1 derivadas de uma linhagem de melanócitos não tumorigênicos, melan-a (Oba-Shinjo *et al.*, 2006), foram previamente transfectadas com o gene de galectina-3 humano. Os plasmídeos utilizados na transfecção das células, pEF1-neo e pEF1neo/galectina-3, foram gentilmente cedidos pelo Dr. Fu-Tong Liu (Universidade da Califórnia, Davis). Esse plasmídeo contém um sítio de restrição para a enzima EcoRI, onde foi inserido o gene de galectina-3, o promotor humano pEF e os genes de resistência a ampicilina e neomicina (este último confere resistência ao antibiótico geneticina). Três diferentes clones de células Tm1 transfectadas com pEF1-neo e pEF1neo/galectina-3 foram utilizados na realização dos experimentos abaixo relatados, apresentando resultados semelhantes. Independente do clone celular utilizado, os mesmos foram aqui denominados células Tm1galectina-3 negativas e positivas (Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺, respectivamente). As figuras contidas nesse trabalho ilustram os resultados representativos de cada ensaio realizado.

As células Tm1gal-3⁺ e Tm1gal-3⁻ foram mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma), pH 6,9, suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB; Gibco BRL) e geneticina (1mg/mL; Gibco, BRL), em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi

trocado a cada 48 horas e, ao atingir a confluência, as células foram lavadas com solução PBS/EDTA, pH 7,2-7,4, destacadas dos frascos com solução 0,2% de tripsina (Instituto Adolfo Lutz, S.P.) e transferidas para novos frascos de poliestireno na proporção de 1:3.

Animais

Foram utilizados camundongos singênicos da linhagem C57BL/6, provenientes do Biotério central da Faculdade de Medicina da USP, e animais C57BL/6 nocautes para o gene de galectina-3, gerados a partir de matrizes gentilmente cedidas pelo Dr. Fu-Tong Liu (University of Califórnia, Davis). Estes últimos tratam-se de animais geneticamente modificados, retrocruzados para o “*background*” C57BL/6. Em todos os experimentos foram utilizados animais fêmeas com cerca de 2 meses de idade. Os animais foram mantidos em biotério de experimentação, recebendo ração e água *ad libitum*. Os animais foram sacrificados ao término dos experimentos, de acordo com as recomendações do painel de eutanásia da *American Veterinary Medical Association*.

2. Análise do acúmulo de galectina-3 por Western Blot.

2.1 Extração de proteínas citoplasmáticas e nucleares.

Células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ foram destacadas dos frascos de cultura com solução de tripsina, lavadas 1 vez com PBS (tampão salina fosfato) e o *pellet* ressuspensionado em tampão de lise (Triton X-100 1%, NaCl 150mM, Tris 50mM pH 7,4, EDTA 5mM, aprotinina 2μg/mL e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF) 1mM). A suspensão celular foi mantida a 4°C por 15 minutos. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubos de polietileno (tubos de minicentrífuga) de 1,5 mL. Esse extrato solúvel contém a

fração de proteínas citoplasmáticas das células. Para a extração das proteínas nucleares, o *pellet* resultante dessa centrifugação foi ressuspendido em tampão de extração de proteínas nucleares (Hepes 20 mM, $MgCl_2$ 1,5mM, EDTA 0,2 mM, NaCl 630mM, glicerol 25%, DTT (dietiltritol) 0,5mM, PMSF 1mM, e aprotinina 2 μ g/mL; pH 7,9) e a extração procedeu como descrito anteriormente. Ambos extratos foram mantidos a -20°C até o momento de uso.

2.2 Quantificação protéica.

A quantificação protéica foi feita segundo o método colorimétrico de Folin, utilizando-se o *kit* da BioRad (*kit DC Protein Assay*; Hercules, CA) conforme instruções do fabricante. Resumidamente, para cada 4 μ l de amostra protéica, acrescenta-se 20 μ l de solução de tartarato de cobre e 160 μ l de reagente de Folin. As proteínas reagem com o cobre em meio alcalino e então reduzem o reagente de Folin. A coloração resultante é decorrente dos aminoácidos tirosina e triptofano (e, em menor extensão, pela cisteína e histidina) e a absorbância determinada em espectrofotômetro a 620 nm. Os valores obtidos foram convertidos em mg/mL por análise de regressão linear pelo programa GraphPad (versão 4.0) baseados na leitura da absorbância de quantidades conhecidas de albumina sérica bovina.

2.3 Eletroforese e transferência para membrana PVDF.

Trinta microgramas de proteína citoplasmática e nuclear extraídas de células Tm1gal-3⁺ e Tm1gal-3⁻ foram diluídos em tampão não redutor de Laemmli 2X (SDS 10%, glicerol, Tris 1M pH 6,8), aquecidos por 5 minutos a 100°C, e aplicados em gel de

poliacrilamida 10% (Tris-HCl 1,5M, pH 8,8, SDS 0,4%, acrilamida 10%, APS (persulfato de amônio) 0,3%, TEMED 0,015%). O gel de empilhamento foi preparado com Tris 500mM pH 6,8, SDS 0,4%, acrilamida 4%, APS 0,05% e TEMED 0,025%. A eletroforese foi feita em tampão Tris 25mM, glicina 190 mM e SDS 0,1%, sob a voltagem de 50V durante 4 horas.

Após a separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (*Hydrophobic polyvinylidene difluoride*; GEHealthcare) previamente umedecida em metanol e água destilada. A transferência foi realizada a 80V durante 1 hora em tampão Tris 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20% (v:v) a 4°C. Finda a transferência, a membrana foi novamente embebida em metanol e água destilada e imersa em PBS acrescido de leite Molico[®] desnatado 5% (v:v) (Nestlé) por 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação constante, para o bloqueio de sítios de ligação inespecíficos. A seguir, a membrana foi imersa em solução derivada de hibridoma TIB-166 (*American Type of Culture Collection, ATCC*) produtor do anticorpo primário monoclonal anti-galectina-3 M3/38, a 4°C por um período de 8 a 12 horas ou a temperatura ambiente durante 1 hora. A incubação com anticorpo secundário (anti-imunoglobulina G de rato conjugada a peroxidase, Sigma, St Louis, MO), na titulação de 1:500 em PBS, foi feita a temperatura ambiente durante 1 hora, também sob agitação constante. Após sucessivas lavagens com PBS/5% de leite (3 vezes de 10 minutos), a detecção da presença de galectina-3 foi feita através de método colorimétrico no qual a membrana foi imersa em solução composta por 7,5 mL de PBS, 20 µL de peróxido de hidrogênio e 5mg de DAB (3,3'-diaminobenzidina, Sigma). A interrupção da reação da peroxidase foi feita com água destilada.

3. Curva de proliferação de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ *in vitro*.

Células Tm1gal-3⁻ e gal-3⁺ foram semeadas (em triplicata) em placas de 6 poços na densidade de 5×10^4 /poço e mantidas nas mesmas condições descritas anteriormente. A contagem do número de células foi feita com o auxílio de um hemocítômetro manual, em microscópio de luz invertido, a cada 24 horas durante 7 dias. Para tal, as células foram lavadas com solução PBS/EDTA (pH 7,2-7,4), destacadas dos poços com solução de tripsina (0,2%) e ressuspensas em volume conhecido de meio RPMI, pH 6,9, acrescido de soro (5%). A contagem foi feita em câmara de Neubauer e a suspensão celular foi adicionado azul de tripan (0,2%; Sigma, St. Louis, MO) para exclusão de células com perda de integridade da membrana plasmática. O tempo de duplicação foi calculado com base no número de células absoluto obtidos na curva de proliferação pelo programa GraphPad versão 4.0 (Regressão não linear, Curva de crescimento exponencial).

4. Ensaio de sensibilidade dos clones Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ à estaurosporina.

A sensibilidade dos clones à estaurosporina foi feita pela quantificação das células com DNA fragmentado (i.e., células hipodiplóides) através da avaliação da fluorescência de iodeto de propídio em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson). Iodeto de propídio (PI; Sigma) é um corante fluorescente solúvel em água que se intercala nas bases do DNA sem especificidade. A excitação foi feita com laser de íon-argônio (488nm) com a intensidade de fluorescência medida utilizando-se filtro de 620nm, sendo analisadas 10^4 células em cada amostra.

Nesse ensaio, as células foram semeadas, em triplicatas, em placas de 6 poços na densidade de 5×10^5 células/poço e mantidas nas condições descritas no item 1. No dia seguinte, o meio foi trocado por meio sem geneticina e foi adicionada estaurosporina (Sigma) na concentração final de 200 nM. Estaurosporina é um inibidor não específico de serino/treonina quinases que induz apoptose em diferentes tipos celulares através do aumento de cálcio citosólico. Após 4 horas de tratamento, o meio de cultura foi recolhido em tubos de polietileno de 15 mL, as células destacadas dos frascos (como mencionado anteriormente) e, juntamente com os respectivos meios, centrifugadas a 1.200 rpm por 4 minutos. O *pellet* celular foi ressuscitado em etanol 70% e as amostras foram mantidas a -20°C por pelo menos 2 horas. A seguir, as amostras foram lavadas 2 vezes com PBS, o *pellet* ressuscitado em 200 μL de solução contendo Triton X-100 (0,1%, v/v), RNase A (0,2 mg/mL), e PI (20 $\mu\text{g/mL}$), e as amostras foram então incubadas a temperatura ambiente por 30 minutos protegidas da luz. Findo esse período, a intensidade de fluorescência de cada amostra foi adquirida e quantificada em FACSCalibur (citômetro de fluxo) e os dados analisados no programa CellQuest.

5. Cinética de implantação de tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ e caracterização morfológica do microambiente tumoral no coxim plantar de camundongos selvagens C57BL/6.

5×10^5 células Tm1gal-3⁻ e gal-3⁺ (em 50 μL de meio RPMI) foram injetadas no coxim plantar das patas posteriores de 10 camundongos fêmeas C57BL/6 (na pata esquerda e na direita do animal decúbito dorsal, respectivamente). Após 24 horas, 3, 6 e 9 dias da injeção, os animais foram sacrificados, as patas foram removidas e imersas em formol tamponado (3,7 % em PBS) por pelo menos 18 horas. A seguir, fez-se lavagens

sucessivas com água destilada para remoção do formol; as patas foram então divididas em 3 partes e mantidas em ácido nítrico 5% durante 6 horas para descalcificação. Para a remoção total do ácido nítrico, os exemplares foram lavados em água corrente durante 1 hora, e então mantidos em etanol 70% até o preparo dos cortes para análise imunohistoquímica com os anticorpos anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e anti-galectina-3. O mesmo procedimento é utilizado no preparo de fragmentos dos tumores subcutâneos, exceto a etapa em ácido nítrico.

6.Histo e imunoistoquímica do microambiente de tumores implantados no coxim plantar e no subcutâneo de camundongos C57BL/6.

Após o procedimento descrito acima, o material foi incluído em blocos de parafina. Cortes de 3µm de espessura foram obtidos em micrótomo manual e coletados em lâminas silanizadas (Superfrost, Erviegas). Os cortes foram desparafinizados como descrito a seguir: xilol a 60°C por 20 minutos, xilol a temperatura ambiente por 20 minutos, etanol 100% por 30 segundos, etanol 85% por 30 segundos e etanol 70% por 30 segundos. Finda essa etapa, sucessivas lavagens foram feitas para retirada total da parafina. Após a fervura de tampão citrato 10 mM pH 6,0 em panela de pressão, as lâminas foram mergulhadas nessa solução e a panela foi lacrada com a válvula de segurança aberta. O vapor saturado foi retirado e, 4 minutos após a pressurização total, a panela foi colocada sob água corrente por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram retiradas da panela, mantidas em temperatura ambiente também por 10 minutos e lavadas em água corrente e destilada. Antes da incubação com os anticorpos, fez-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% durante 5 minutos (esse procedimento foi feito 4 vezes). Novamente, as lâminas foram lavadas em água

corrente, água destilada e em PBS 10mM, pH 7,4, por 5 minutos. Para o bloqueio de sítios inespecíficos, as lâminas foram incubadas com soro normal de cavalo (5%; Vector) em PBS contendo albumina 1% e azida sódica 0,1%, por 20 minutos a 37°C em câmara úmida. O soro foi removido e as lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS acrescido de 1% de albumina bovina e 0,1% de azida sódica. A incubação foi feita a 4°C, pelo período de 18 horas, em câmara úmida. A titulação dos anticorpos utilizados foi: PCNA (1:6000, anti-mouse, Dako), CD34 (1:100, anti-goat, Santa Cruz), e galectina- 3 (1:32, M3/38, Híbridoma TIB-166). Finda a incubação dos anticorpos primários, as lâminas foram lavadas com PBS com 3 trocas de 3 minutos cada e incubadas com anticorpo secundário biotilado diluído em PBS (anti-cabra 1:200 (Vector) para CD34; anti-mouse 1:200 (Dako) para PCNA, anti-rat 1:500 (Vector) para galectina-3). A incubação foi feita a 37°C por 30 minutos. Após lavagem em PBS (3 trocas de 3 minutos cada), as lâminas foram incubadas com estreptoavidina e peroxidase biotilada na titulação de 1:200, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C. Novamente, as lâminas foram lavadas em PBS (3 trocas de 3 minutos cada) e, então, incubadas com a solução contendo o substrato DAB (3,3-tetraidroclorato de diaminobenzidina), 1mL de DMSO, 1mL de H₂O₂ 6%, 100mL de PBS, por 5 minutos protegido de luz. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 3 minutos, contracoradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, novamente lavadas em água corrente e destilada e, antes da última lavagem, as mesmas foram imersas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%). Finalmente, as lâminas foram desidratadas como descrito a seguir: etanol 85% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 95% por 30 segundos, etanol 100% por 30 segundos, e xilol por 4 vezes de 30 segundos cada. A montagem das lâminas foi feita em *Entellan neu*. As

imagens foram analisadas em microscópio de luz (Nikon Eclipse E600) e adquiridas usando-se a câmara digital Nikon DXM 1200F.

7. Análise do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o gene de galectina-3.

Vinte camundongos selvagens da linhagem C57BL/6, divididos em 2 grupos compostos por 10 animais cada, receberam injeção subcutânea de células Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺ (5×10^5 células/100 μ L de meio RPMI/animal; dia 0). No caso dos animais nocautes, 4 receberam injeção de células Tm1gal-3⁻ e 5 de Tm1gal-3⁺. Todos os grupos de animais foram observados diariamente para monitoração do aparecimento e crescimento dos tumores. As dimensões dos tumores (eixo maior e menor da elipse) foram medidas com auxílio de um paquímetro, e o volume foi calculado segundo a fórmula $V = 0,52 \times (\text{eixo menor})^2 \times \text{eixo maior}$ (onde V representa o volume). Tumores com medidas de ambos eixos inferiores a 0,4 cm foram classificados como tumores palpáveis não mensuráveis. Os animais foram sacrificados quando ao menos um animal apresentou volume tumoral igual a 1 cm³. Após a remoção cirúrgica, a medida da massa em gramas dos tumores foi feita em balança digital. Cada tumor foi dividido em 2 partes destinadas à análise imunoistoquímica e a extração de RNA, procedimento descrito abaixo.

8. Extração, quantificação e integridade do RNA dos tumores

Após remoção cirúrgica, o tumor de cada animal foi individualmente lavado em PBS e embebido em 2 mL de Trizol® (Invitrogen). Cada amostra tumoral foi rapidamente homogeneizada em Politron (Kinematica) e a fração solúvel transferida

para tubos de minicentrífuga para centrifugação (2.600 rpm, 15 minutos, 4°C). Os sobrenadantes foram então transferidos para novos tubos de polietileno livres de RNase e mantidos à temperatura ambiente por 5 minutos para a dissociação completa de complexos nucleoprotéicos. A seguir, adicionaram-se 400µl de clorofórmio a cada amostra, as quais foram homogeneizadas por inversão por cerca de 15 segundos e mantidas a temperatura ambiente por 2,5 minutos. Para a separação da fração que contém RNA, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos e a fase aquosa (fase superior que contém RNA) foi transferida para novos tubos de polietileno (livres de RNase). A próxima etapa consistiu na precipitação do ácido ribonucléico. Para tal, 1mL de álcool isopropílico foi adicionado em cada amostra que foram, então, incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. Findo esse período, as amostras foram centrifugadas a 11.000 rpm durante 10 minutos, o sobrenadante foi removido e o *pellet* lavado com 2mL de etanol 75%. Após serem homogeneizadas em vórtex, as amostras foram novamente centrifugadas a 7.500 rpm por 5 minutos, o *pellet* foi dissolvido em água DEPC (dietil-piromcarbonato), no volume de 10 a 50 µL, dependendo da quantidade de material precipitado), e as amostras incubadas a 60°C por 10 minutos para dissolução completa do RNA. Em seguida, as mesmas foram mantidas a -70°C até o momento de uso.

A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro a 260 nm. Para cada 1µL de amostra foram acrescidos 199µL de água DEPC e a leitura foi feita no espectrofotômetro *GeneQuant Pro* (GE Healthcare). A integridade do RNA total foi confirmada após eletroforese em gel analítico de agarose (agarose 0,8%, MOPS (3-(N-morfolino)-ácido propanosulfônico 1X), formaldeído 5% (v/v), e H₂O milli-Q autoclavada) com a visualização de bandas ribossomais 28 e 18 íntegras. Assim, para

cada 1µL da amostra adicionou-se 8 µL de tampão de RNA 5X (glicerol 50%, EDTA 1mM, pH 8,0, bromofenol blue 0,25%, xileno cianol, 0,25%) sob o gelo. Em seguida, as amostras foram aquecidas em banho seco a 65°C por 15 minutos para denaturação e, antes de serem aplicadas no gel, foi adicionado 1µL de brometo de etídio 0,5 mg/mL. A eletroforese foi feita a 100V durante 2 horas em tampão MOPS 1X. A visualização das bandas ribossomais foi feita em transiluminador (ImageMaster, Pharmacia).

9. Ensaio de proteção à ribonuclease (*Ribonuclease Protection Assay-RPA*)

Esse ensaio consiste na síntese de moléculas de RNAm anti-senso marcadas com UTP [$\alpha^{32}\text{P}$] que são utilizadas como sondas para detecção de RNAm específicos existentes nas amostras dos tumores subcutâneos. O ensaio foi feito utilizando-se o *kit mAngio-1 Multi-Probe Template Set* (BD Biosciences) em que se analisa a expressão dos seguintes genes: VEGF e seu receptor (FLT-1), VEGF-C e seu receptor (FLT-4), receptores de angiopoietina 1 e 2 (TIE-2 e -1, respectivamente), angiopoietina-1, CD31/PECAM 1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), endogлина (CD105), receptor de trombina, e os controles L32 (proteína ribossomal) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase). Todas as etapas foram feitas seguindo-se as instruções do fabricante e será brevemente descrita a seguir. Para a síntese da sonda radioativa, utilizou-se 1µL de inibidor de RNase (RNasin), 1µL do *pool* de nucleotídeos GACU, 2µL de dietiltrietol (DTT), 4µL de tampão de transcrição 5X, 1µL da *template set* (mistura dos moldes de DNA de interesse), 10µL de [$\alpha^{32}\text{P}$] (G.E. Healthcare) e 1µL de RNA polimerase T7. Após leve agitação, o *mix* foi mantido em banho seco a 37°C por 1 hora. Para interromper a síntese da sonda, adicionou-se 2µL de DNase ao *mix* que permaneceu na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foi adicionado 26µL

de EDTA 20 mM, 25µL de fenol saturado com Tris-HCl, 25µL de clorofórmio:álcool isoamílico 50:1, 25µL de RNAt de levedura; o *mix* foi homogeneizado vigorosamente em vórtex e centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo de polietileno (livre de RNase), ao qual foi acrescentado 50µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1) antes do mesmo ser submetido a nova centrifugação (13.000 rpm durante 2 minutos a temperatura ambiente). Novamente, a fase superior aquosa foi transferida para um tubo (de polietileno livre de RNase), contendo 50µL de acetato de amônio 4M e 250µL de etanol absoluto gelado. O material foi homogeneizado por inversão e mantido a -70°C por 30 minutos. Após esse período, o material foi centrifugado (13.000 rpm, 15 minutos a 4°C), o *pellet* ressuspenso em 100µL de etanol 90% gelado e submetido a nova centrifugação (13.000 rpm, 5 minutos, 4°C). O *pellet* foi solubilizado em 30µL de tampão de hibridação e utilizou-se 1µL dessa solução (que fora diluída em 5mL de líquido de cintilação) para a contagem em cpm (contagem por minuto) da quantidade de radiação (contador beta, Beckam). Dez microgramas de RNA extraído dos tumores foram utilizados para hibridação com a sonda radioativa. Assim, para cada amostra de RNA tumoral adicionou-se 2µL da sonda (7,5 cpm/amostra) e o volume foi completado com tampão de hibridação totalizando-se 8µL por amostra. Após 3 minutos em banho seco a 90°C, as amostras foram então incubadas a 56°C por 12 a 16 horas. Findo o período de hibridação das amostras com a sonda, as mesmas foram tratadas com *cocktail* de RNase (composto por tampão de RNase, RNase A e RNase T1), centrifugadas (13.000 rpm, 10 minutos) e mantidas por 45 minutos a 30°C. A seguir, a fase inferior das amostras foi transferida para tubos contendo 18µL de *cocktail* de proteinase K (tampão de proteinase K, proteinase K e RNA transportador de levedura), e, após rápida homogeneização e

centrifugação, as amostras foram incubadas a 37°C por 15 minutos. Findo esse período, foram adicionados 65µL de fenol saturado em Tris-HCl e 65µL de clorofórmio:álcool isoamílico (50:1) antes de nova centrifugação (13.000 rpm, 5 minutos). A fase superior resultante foi transferida para tubos de polietileno contendo 120µL de acetato de amônio e 650µL de etanol absoluto gelado; a mistura foi homogenizada por inversão e incubada a -70°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 15 minutos a 4°C), o *pellet* ressuscitado em 100µL de etanol 90% gelado e novamente as amostras foram centrifugadas (13.000 rpm, 5 minutos a 4°C). Finalmente, o *pellet* foi ressuscitado em 5µL de tampão de aplicação 1X e, antes de aplicadas em gel denaturante de poliacrilamida, as amostras foram mantidas em banho seco a 90°C por 3 minutos. A eletroforese foi feita a 50 W em tampão TBE 0,5 X (Tris base 445mM, borato 445mM, EDTA 10mM). Após a corrida, o gel foi seco e colocado em cassete com filme de raio X (Hyperfilm, GE Healthcare) para autorradiografia a -70°C por um período de 1 a 3 dias (dependendo da saturação do filme correspondente a emissão da radiação das bandas controle, L32 ou GAPDH). A revelação do filme foi feita em câmara escura, onde o filme foi imerso em solução reveladora (1 a 2 minutos; Kodak), lavado em água e imerso em solução fixadora (Kodak) por 10 minutos. A captura das bandas foi feita em um digitalizador de imagens (ImageMaster, Pharmacia) e as bandas foram quantificadas por densitometria (através da leitura da densidade óptica das mesmas) pelo programa Image Master.

10. Análise morfométrica dos cortes imunoistoquímicos de tumores subcutâneos.

Os tumores analisados por imunoistoquímica e os corados com hematoxilina/eosina foram analisados em microscópio de luz (Nikon Eclipse E600). As

imagens de todos os campos analisados foram capturadas com a câmara digital DXM1200F (Nikon). Para a quantificação dos diferentes eventos (número de células galectina-3 positivas, números de vasos intratumorais, área vascular e área necrótica) foram adquiridas de 10 a 20 fotomicrografias de cada fragmento tumoral (cobrindo toda a extensão do tumor) sem haver sobreposição das áreas. A seguir, com auxílio de um retículo e de um hemocítômetro, foi computado o número de células positivas e negativas para galectina-3 dentro da área delimitada pelo retículo em cada imagem (fotomicrografia). No caso das estruturas vasculares foi computado o número de pontos do retículo que incidiam dentro da massa tumoral, número de pontos incidentes nas estruturas vasculares (para cálculo da área vascular em relação a área tumoral), e o número de estruturas vasculares com luz visível existentes (com e sem hemácias) na área delimitada pelo retículo. Na quantificação das áreas necróticas, foi computado o número de pontos do retículo que incidiam dentro da massa tumoral não necrótica e de áreas necróticas.

11. Análise estatística

O tempo de duplicação dos clones celulares *in vitro* foi calculado pelo programa GraphPad, versão 4.0 (Regressão não linear), e possíveis diferenças estatisticamente significantes foram analisadas pelo teste T pareado. Os dados de sensibilidade dos clones à estaurosporina foram analisados pelo teste Two-way ANOVA (One-way ANOVA) seguido pelo teste de Bonferroni e possíveis diferenças consideradas significantes quando $p < 0.05$.

A análise estatística dos experimentos realizados *in vivo* consistiu em 2 etapas: primeiramente, os dados foram submetidos a um teste para inferência a respeito da

distribuição normal dos mesmos (teste de Normalidade). A seguir, após confirmação dos dados obedecerem curva de distribuição Normal, os mesmos foram analisados pelo teste Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni e as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

A análise estatística dos dados morfométricos foi realizada da seguinte forma: para cada tumor, o número de eventos (ou pontos do retículo incidentes no parênquima tumoral, vasos neoformados e em áreas necróticas) obtidos em cada campo analisado foi submetido ao teste de Normalidade (para cada tumor foram avaliados de 10 a 20 campos). A seguir, foi calculada a média aritmética e o desvio padrão (da variável em questão) de todos os campos pertencentes ao mesmo fragmento tumoral. Essa média foi considerada como uma replicata (que faz menção a um único tumor) de um grupo experimental. Assim, a análise de variância (One-way ANOVA) foi feita comparando-se as replicatas (médias aritméticas) entre os diferentes grupos seguido pelo teste de Bonferroni e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (o número de replicatas de cada grupo corresponde, então, ao número de animais inoculados com células Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺).

Quanto aos dados gerados no ensaio de RPA, após a captura da imagem, a densidade óptica das bandas (visíveis) foi obtida utilizando-se o programa Image Master. A razão entre a densidade óptica da banda correspondente ao RNAm de VEGF e do controle L32 foi calculada para cada replicata. A comparação entre os 2 grupos experimentais (animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺) foi feita utilizando-se o teste *t* de Student (os dados foram considerados significantes somente quando $p < 0,05$). Todas análises estatísticas acima mencionadas foram calculadas com ajuda do programa GraphPad versão 4.0.

RESULTADOS

Acúmulo de galectina-3 em células de melanoma murino Tm1 transfectadas.

Diferentes clones de células Tm1 transfectadas ou não com o gene de galectina-3 foram utilizados na realização dos experimentos abaixo relatados. Anteriormente a realização de qualquer ensaio, o acúmulo da proteína galectina-3 nos diferentes clones, tanto nas frações citoplasmática como na nuclear, foi determinado por *Western Blot*. A Figura 1 ilustra um ensaio representativo com os clones celulares galectina-3 negativo e positivo (células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺, respectivamente), onde se verifica a presença de galectina-3 no citoplasma e núcleo das células transfectadas com esse gene.

Crescimento de células Tm1 gal-3⁻ e Tm1 gal-3⁺ *in vitro*

Ambas células exibiram fase de latência relativamente longa- somente 100 horas (4 dias aproximadamente) após a semeadura, os clones apresentaram crescimento exponencial (fase *log*; Figura 2A). Não foi observada diferença significativa entre o tempo de duplicação de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ (24 e 22 horas, respectivamente; análise de regressão não-linear, n= 3).

Sensibilidade à morte de células Tm1 gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺

Nesse ensaio, as células foram tratadas com diferentes concentrações de estaurosporina, um indutor inespecífico de apoptose, por 4 horas e a avaliação da fragmentação do DNA (porcentagem de células hipodiplóides) marcado com iodeto de propídeo foi feita por citometria de fluxo, utilizando-se o programa CellQuest. Como observado na Figura 2B, células que expressam ou não o gene de galectina-3 são igualmente sensíveis às diferentes concentrações de estaurosporina (0,1 µM, 0,5 µM e

2,5 μM). Ainda, em ambos os casos, a porcentagem de células hipodiplóides foi maior no grupo tratado com 0,1 μM de estaurosporina. Provavelmente, o processo de morte decorrente da incubação das células com concentrações mais elevadas dessa droga (0,5 e 2,5 μM) não seja exclusivamente por apoptose.

Cinética de recrutamento de células estromais galectina-3 positivas no microambiente tumoral no coxim plantar de camundongos C57/BL6 selvagens.

Cortes seriados de 3 μm de espessura das patas posteriores de animais inoculados com células de melanoma Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺ foram analisados. As figuras de número 3 e 4 mostram a imunoistoquímica feita com anticorpos reativos à PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*- antígeno nuclear de proliferação celular) e galectina-3 após 1, 3, 6 e 9 dias da injeção intrafascial de células de melanoma (Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺). Células imunoreativas à PCNA foram encontradas em ambos grupos experimentais, independente do período analisado. Essas células correspondem, em sua maioria, às células tumorais em proliferação; eventualmente algumas células inflamatórias recrutadas para a massa tumoral podem estar em estado proliferativo e, portanto, PCNA positivas. Independentemente do tipo celular, células imunoreativas a esse anticorpo apresentam marcação nuclear intensa de coloração castanha (Figuras 3 e 4 A, C, E e G).

Nos animais inoculados com células Tm1gal-3⁻, as células galectina-3 positivas existentes na massa tumoral correspondem exclusivamente às células inflamatórias de origem monocítica. Após o primeiro dia, observa-se células com intensa marcação nuclear e citoplasmática, de coloração castanha avermelhado (Figura 3B). Após 3 dias, pode-se notar ainda um intenso infiltrado de células estromais galectina-3 positivas no

sítio de injeção de células tumorais nestes animais (Figura 3D). A razão entre células galectina-3 positivas (i.e., células monocíticas) e células tumorais parece diminuir somente após 6 dias da injeção (Figura 3F). Após 9 dias, ainda existem células monocíticas na massa tumoral e, nesse caso, pode-se notar que as células galectina-3 positivas apresentam projeções dendríticas, núcleo e citoplasma intensamente marcados (Figura 3H).

Nos animais injetados com células Tm1gal-3⁺ também se verifica a presença de células tumorais e monocíticas positivas para galectina-3 um dia após a injeção (Figura 4B). O padrão de marcação e coloração dessas células foi o mesmo observado no grupo controle (Tm1gal-3⁻). É interessante notar a presença de células tumorais transfectadas com o gene de galectina-3 negativas para essa lectina (indicadas por setas). Após 3 dias, a imunomarcação de galectina-3 nas células no microambiente tumoral se mostrou mais intensa e homogênea, i.e., a área marcada abrange praticamente toda a extensão da massa tumoral (do microambiente), dificultando a discriminação entre células tumorais e monocíticas com base na morfologia das mesmas (Figura 4D). A razão entre número de células galectina-3 positivas e negativas na massa tumoral diminui 6 dias após a injeção (Figura 4F). Dentre as positivamente marcadas, encontram-se células tumorais que ainda acumulam essa lectina e células monocíticas que se encontram no microambiente tumoral. Essas últimas apresentam citoplasma e núcleo intensamente marcados e morfologia dendrítica. Algumas poucas células tumorais ainda acumulam galectina-3 após 9 dias da injeção, como indicado pelas setas (Figura 4H).

Análise da implantabilidade e do crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3.

Sete dias após a injeção subcutânea de células de melanoma transfectadas ou não com o gene de galectina-3 (Tm1gal-3⁺ e Tm1gal-3⁻, respectivamente), 40% dos animais de fenótipo selvagem injetados com células Tm1gal-3⁻ apresentavam tumores palpáveis não mensuráveis, enquanto que o mesmo foi observado somente em 10% dos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺. Quanto aos camundongos nocautes, 25% daqueles injetados com Tm1gal-3⁻ apresentavam massa tumoral palpável, mas não mensurável, somente no 8º dia após a injeção de células. Interessantemente, observou-se um retardo ainda maior no aparecimento de massas tumorais palpáveis nos animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁺; nesse grupo, tumores palpáveis não mensuráveis só foram observados no 10º dia após injeção das células (Figura 5A).

Com relação ao volume dos tumores em função do tempo, não foram observadas diferenças significantes entre os animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺ ao longo de 11 dias. Interessantemente, até o 11º dia, quando os animais foram sacrificados, nenhum animal nocaute inoculado com células Tm1gal-3⁺ apresentou tumor de dimensões mensuráveis (Figura 5A).

No 11º dia após o implante de células tumorais, os tumores foram removidos cirurgicamente e a massa (bruta) medida em gramas. Como ilustrado na figura 5B, não há diferença significativa na massa entre os tumores originados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ nos animais selvagens ou nos nocautes. Entretanto, comparando-se essa mesma variável (massa) entre os fenótipos dos animais (selvagem versus nocaute), observa-se que a massa tumoral dos animais nocaute é significativamente menor quando comparadas as dos animais selvagens, independente do nível de expressão do gene de

galectina-3 na célula tumoral (i.e, independente do fenótipo celular). Os números a seguir indicam a massa dos tumores em gramas $\pm$ desvio padrão nos animais selvagens injetados com Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺ e nos animais nocautes injetados com Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺, respectivamente: 0,211 $\pm$ 0,16, 0,161 $\pm$ 0,077, 0,121 $\pm$ 0,078, 0,022 $\pm$ 0,004 ($p < 0,022$, Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, $n=10$ em ambos grupos de animais selvagens, $n=4$ no grupo de animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁻ e $n=5$ no grupo de animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁺).

Análise do microambiente tumoral subcutâneo de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para galectina-3.

A caracterização do microambiente tumoral subcutâneo foi feita através de análises qualitativas e morfométricas de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina, além de preparações imunoistoquímicas com anticorpos reativos a galectina-3 e CD34. O parênquima tumoral, independentemente do fenótipo do animal e da célula inoculada, é constituído por células malignas, geralmente de diâmetro superior ao das células estromais, com pleomorfismo nuclear e nucléolos evidenciados. O estroma desses tumores é constituído principalmente por células endoteliais e por leucócitos inflamatórios, principalmente células de origem monocítica. São tumores melanóticos, com pouca matriz extracelular fibrosa e que não apresentam uma organização tecidual-uma característica comum de diversos neoplasmas.

Quanto à resposta angiogênica, primeiramente foi avaliada a área ocupada por estruturas vasculares CD34 positivas e com luz visível nos tumores dos 3 grupos experimentais (animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ e animais nocautes inoculados com Tm1gal-3⁺). Como ilustrado na figura 6, independente

do fenótipo do animal, tumores derivados de células Tm1gal-3⁺ exibem menor extensão de área vascular: $0,48 \pm 0,366\%$ nos animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁺, $0,421 \pm 0,323\%$ nos nocautes inoculados com Tm1gal-3⁺ e $1,746 \pm 0,945\%$ nos animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁻. Os números indicam a porcentagem de área vascular $\pm$ desvio padrão; $p < 0,001$, One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, $n=10$ em ambos grupos de animais selvagens e $n=5$ no grupo de animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁺. Com relação ao número de estruturas vasculares, não foi observada diferença nos 3 grupos (Figura 7A). Vale mencionar que nessa análise morfométrica foram quantificadas estruturas vasculares CD34 positivas, com e sem hemácias. Entretanto, foram considerados vasos funcionais somente as estruturas vasculares (CD34 positivas) que continham hemácias no lúmen dos vasos; nesse caso, o número de vasos funcionais nos animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁺ é significativamente menor comparado ao 2 outros grupos ($0,003 \pm 0,003$ nos animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁺, $0,02 \pm 0,017$ nos animais nocautes inoculados com Tm1gal-3⁺ e $0,027 \pm 0,021$ nos selvagens inoculados com Tm1gal-3⁻. Os números representam o número de vasos funcionais $\pm$ desvio padrão; $p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, $n=10$ em ambos grupos de animais selvagens e $n=5$ no grupo de animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁺; Figura 7B).

Analizou-se a presença de células estromais galectina-3 positivas no microambiente desses tumores. Nos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁻, as células imunoreativas para esse anticorpo correspondem exclusivamente às células inflamatórias de origem monocítica, que apresentam marcação citoplasmática e nuclear para essa lectina animal. Quanto a distribuição topográfica dessas células na massa

tumoral, as mesmas são observadas em áreas hemorrágicas, necróticas e também no tecido não necrótico (Figura 8A). Esse mesmo padrão de marcação celular e de distribuição/localização na massa tumoral foi observado nos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺ (Figura 8B). A porcentagem de células galectina-3 positivas no microambiente não difere entre esses 2 grupos experimentais (12,83±5 % e 12,64±5 % nos tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺, respectivamente. Os valores representam a média aritmética ± desvio padrão, Figura 8D). Assim como já fora observado em outros experimentos, nota-se a perda do acúmulo de galectina-3 pela maioria das células tumorais transfectadas com esse gene.

O mesmo tipo de análise foi feita nos cortes histológicos de tumores de animais nocautes para o gene de galectina-3 inoculados com células Tm1gal-3⁺, nos quais as células imunoreativas correspondem a 3,7% (desvio padrão de 1,3%) do total de células do microambiente tumoral. Nesses animais, essas células correspondem única e exclusivamente às células tumorais que ainda acumulam essa proteína, tanto no citoplasma como no núcleo, e que apresentam mesmo padrão de marcação acima mencionado (Figura 8C).

A avaliação morfológica/histológica dos tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ em animais selvagens e nocautes revelou a presença de regiões necróticas diferenciadas pela presença de núcleos picnóticos, *debris* celulares e pela coloração hialina característica de preparações histoquímicas coradas com hematoxilina e eosina. Quantitativamente, os tumores originados de células Tm1gal-3⁻ injetadas em animais selvagens apresentaram maior extensão de área necrótica comparados ao grupo selvagem injetado com células galectina-3 positivas (11,6±9,9 e 2,7±6,65,

respectivamente. Os números representam a porcentagem de área necrótica dos tumores $\pm$ desvio padrão, respectivamente; $p < 0,05$, One-way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni, $n=10$ em ambos grupos). Quanto ao animal nocaute, a porcentagem de área necrótica na massa tumoral derivada de células Tm1gal-3⁺ mostrou-se similar à dos animais selvagens inoculados com células de mesmo fenótipo (Figura 11). Infelizmente, problemas no processo de embebição em parafina dos tumores derivados de células Tm1 negativas para galectina-3 injetadas nos animais nocautes impossibilitaram a análise qualitativa e morfométrica da área necrótica e do número de vasos sanguíneos neoformados nesse grupo.

Análise da expressão gênica de fatores angiogênicos no microambiente tumoral-ensaio de proteção a ribonuclease.

Nesse ensaio foi avaliada a expressão dos seguintes genes: VEGF-A e seu receptor (Flt-1), VEGF-C e seu receptor (Flt-4), receptores de angiopoietina 1 e 2 (TIE-2 e -1, respectivamente), angiopoietina 1, CD31/PECAM 1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), endogлина (CD105), receptor de trombina, e os controles L32 (proteína ribossomal) e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Como ilustrado na autoradiografia (Figura 9), os níveis de expressão de todos os genes são menores nos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺. De fato, a ausência de transcritos (RNA mensageiro) dos genes codificadores de Flt-1, -4, TIE, TIE2, do receptor de trombina, CD31, VEGF-C, endogлина e angiopoietina-1 nesses animais impossibilitou a realização de uma análise densitométrica para a quantificação relativa dos genes. Entretanto, a detecção de bandas correspondente ao RNA mensageiro de VEGF, apesar de brandas, possibilitou a captura da imagem por um digitalizador de

imagens (reflectômetro) e posterior análise da densidade óptica das mesmas (programa Image Master), o que possibilitou a quantificação e análise estatística dos níveis de expressão de VEGF entre os animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺ ou Tm1gal-3⁻. Como ilustrado na figura 10, há uma diminuição significativa nos níveis de RNAm de VEGF nos animais inoculados com Tm1gal-3⁺ ($p < 0,05$, Teste t de Student não pareado, bicaudal, $n=7$ nos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁻, $n=8$ nos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺, $n=3$ em ambos grupos de animais nocautes).

Nos animais nocautes, independente do fenótipo celulares inoculado, novamente não se observam bandas relativas ao transcrito (RNA mensageiro) dos genes de Flt-1, -4, TIE, TIE2, do receptor de trombina, CD31, VEGF-C e endoglina, sugerindo baixo nível de expressão desses genes no microambiente tumoral desses animais (indetectável por tipo de abordagem). Com relação ao transcrito de VEGF, o nível de expressão relativo desses genes parece ser menor nos animais inoculados com células Tm1 gal-3⁺ (Figura 9).

Figura 1. *Western Blot* de células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3 (Tm1gal-3⁺ e Tm1gal-3⁻, respectivamente). A seta indica a presença de galectina-3 e a massa molecular aparente em kDa da proteína. A linha 1 refere-se a fração citoplasmática de Tm1gal-3⁻, linha 2, fração citoplasmática de Tm1gal-3⁺; linha 3, a fração nuclear de Tm1gal-3⁻; linha 4, a fração nuclear de Tm1gal-3⁺.

(A)

(B)

Figura 2. Crescimento e sensibilidade à morte de células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, *in vitro*. (A) Ambas células foram plaqueadas em densidade conhecida e, a cada 24 horas, o número de células foi determinado durante 7 dias. Findo esse período, o tempo de duplicação foi calculado em 24 e 22 horas para Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺, respectivamente (Análise de regressão não linear). (B) Células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ foram tratadas com diferentes concentrações de estaurosporina por 4 horas quando as mesmas foram fixadas e o DNA marcado com iodeto de propídeo. A análise de fragmentação de DNA foi feita em citômetro de fluxo. Os pontos (A) e as barras (B) representam a média aritmética $\pm$ desvio padrão (n=3).

Figura 3. Cinética de recrutamento de células galectina-3 positivas no microambiente tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens. Células de melanoma murino Tm1gal-3⁻ foram implantadas no coxim plantar de animais selvagens. 1 (A e B), 3 (C e D), 6 (E e F) e 9 dias (G e H) após o implante, o material foi processado, contracorado com hematoxilina e a imunoistoquímica foi realizada com os anticorpos anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* - antígeno nuclear de proliferação nuclear) (A, C, E e G) e anti-galectina-3 (B, D, F e H). A barra equivale a 25 micra (n= 5).

Figura 3.

Figura 4. Cinética de recrutamento de células galectina-3 positivas no microambiente tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens. Células de melanoma murino Tm1 transfectadas com o gene de galectina-3 (Tm1gal-3⁺) foram implantadas no coxim plantar de animais selvagens. 1 (A e B), 3 (C e D), 6 (E e F) e 9 dias (G e H) após o implante, o material foi processado, contracorado com hematoxilina e a imunoistoquímica foi realizada com os anticorpos anti-PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen* - antígeno nuclear de proliferação nuclear) (A, C, E e G) e anti-galectina-3 (B, D, F e H). A barra equivale a 25 micra (n= 5). As setas (F e H) indicam células tumorais Tm1gal-3⁺ que deixam de acumular galectina-3.

Figura 4.

(A)

(B)

Figura 5. Implantabilidade e crescimento tumoral em camundongos C57BL/6 selvagens e galectina-3 nocautes. Células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, foram injetadas subcutaneamente e os animais foram monitorados diariamente por 11 dias. Em (A), as dimensões dos tumores (eixo menor e maior) foram mensurados com um paquímetro, o volume tumoral estimado e plotado em função do tempo. (B) Massa dos tumores em gramas no 11º dia. Em (A) e (B), os histogramas representam a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi feita usando o teste Two-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Diferenças entre os grupos em função do tempo (A) ou peso (B) foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (grupo WT/Tm1gal-3⁻ e WT/Tm1gal-3⁺ $n=10$; grupo KO/Tm1gal-3⁻ $n=4$; grupo KO/Tm1gal-3⁺ $n=5$). WT: animais selvagens (*wild type*), KO: animais nocautes para o gene de galectina-3 (*knockout*).

Figura 6. Área vascular em tumores derivados de células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens e galectina-3 nocautes. Imunoistoquímica de cortes histológicos de tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ em animais selvagens (A e B, respectivamente) e de células Tm1gal-3⁺ em animais nocautes (C). Em (D), área vascular relativa. Os histogramas representam a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi feita usando o teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (grupo WT/Tm1gal-3⁻ e WT/Tm1gal-3⁺ $n=10$; grupo KO/Tm1gal-3⁺ $n= 5$). A barra equivale a 25 micra. WT: animais selvagens (*wild type*), KO: animais nocautes para o gene de galectina-3 (*knockout*), V.vasos (indicados por setas em B e C).

(A)

(B)

Figura 7. Angiogênese em tumores derivados de células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o gene de galectina-3. (A) Número de estruturas vasculares no microambiente de tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ em animais selvagens e nocautes para o gene de galectina-3. (B) Número de vasos funcionais em relação à área tumoral. Em ambos os gráficos cada ponto representa uma replicata (One-way-ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, grupo WT/Tm1gal-3⁻ e WT/Tm1gal-3⁺ n=10; grupo KO/Tm1gal-3⁺ n= 5). WT: animais selvagens (*wild type*), KO: animais nocautes para o gene de galectina-3 (*knockout*).

Figura 8. Presença de células galectina-3 positivas no microambiente tumoral subcutâneo de camundongos C57BL/6 selvagens e galectina-3 nocautes. Imunoistoquímica de cortes histológicos de tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ em animais selvagens (A e B, respectivamente) e de células Tm1gal-3⁺ em animais nocautes (C). Em (D), porcentagem de células galectina-3 positivas no microambiente tumoral. Os histogramas representam a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi feita usando o teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (grupo WT/Tm1gal-3⁻ e WT/Tm1gal-3⁺ $n=10$; grupo KO/Tm1gal-3⁺ $n= 5$). A barra equivale a 25 micra. WT: animais selvagens (*wild type*), KO: animais nocautes para o gene de galectina-3 (*knockout*). As setas indicam células galectina-3 positivas.

Figura 9. Autorradiografia dos níveis de RNA mensageiro de tumores derivados de células de melanoma murino Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ em camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para o gene de galectina-3. 10 µg de RNA de cada tumor foi utilizado para o Ensaio de Proteção a Ribonuclease (RPA). Nesse ensaio, foram analisadas a expressão dos seguintes moléculas angiogênicas CD31 (*platelet endothelial cell adhesion molecule-1*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) e seu receptor Flt-1 (*FMS-like tyrosine kinase-1*), VEGF-C e seu receptor Flt-4 (*FMS-like tyrosine kinase-4*), endogлина (CD105), angiopietina-1 e seu receptor TIE2; o receptor TIE, receptor de trombina; e os controles L32 (proteína ribossomal) e GAPDH (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*). A numeração corresponde as seguintes amostras: 1 a 7, tumores derivados de Tm1gal-3⁻ em animais selvagens, 8 a 15, tumores derivados de Tm1gal-3⁺ em animais selvagens, 16 a 18, tumores derivados de Tm1gal-3⁻ em animais nocautes, 19 a 21, tumores derivados de Tm1gal-3⁺ em animais nocautes. A última linha à direita corresponde às sondas não protegidas (grupo WT/Tm1gal-3⁻ n=7 e WT/Tm1gal-3⁺ n=8; KO/Tm1gal-3⁻ n=3 e KO/Tm1gal-3⁺ n=3).

Figura 10. Níveis de expressão gênica de VEGF em tumores derivados de células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens. A quantificação relativa dos níveis de RNAm de VEGF foi feita por densitometria. Cada ponto representa uma replicata (Teste *t* de Student não pareado, bicaudal; $n = 7$).

Figura 11. Área necrótica relativa em tumores derivados de células de melanoma murino Tm1, transfectadas ou não com o gene de galectina-3, em camundongos C57BL/6 selvagens e galectina-3 nocautes. Em (A) e (B), cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina de tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺, respectivamente, em animais selvagens. (C) representa tumores derivados de células Tm1gal-3⁺ em animais galectina-3 nocautes. Em (D), análise morfométrica de área necrótica relativa (em porcentagem). Os histogramas representam a média aritmética $\pm$ desvio padrão. A análise estatística foi feita usando o teste One-Way ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Diferenças entre os grupos foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (grupo WT/Tm1gal-3⁻ e WT/Tm1gal-3⁺ $n = 10$; e grupo KO/Tm1gal-3⁺ $n = 5$). A barra equivale a 100 micra. WT: animais selvagens (*wild type*), KO: animais nocautes para o gene de galectina-3 (*knockout*), N: necrose.

DISCUSSÃO

Em 2000, Hanahan e Weinberg discorreram de maneira brilhante sobre as alterações moleculares adquiridas por uma célula durante o processo de transformação maligna e a contribuição das células estromais na progressão de tumores. A visão homotípica de tumores foi gradativamente substituída pela visão heterotípica, ampliando o conhecimento sobre os mecanismos operantes no processo de tumorigênese. Entretanto, o papel promotor das células estromais não exclui a importância das alterações genéticas apresentadas pelas células tumorais na progressão de neoplasias e vice-versa. De fato, o comportamento biológico dos tumores é determinado pelas interações entre os diferentes tipos celulares existentes no microambiente. Nesse contexto, exploramos o papel de galectina-3 na progressão de melanoma murino, investigando a contribuição dessa lectina quanto a sua origem (i.e., a participação de galectina-3 na progressão de melanoma quando expressa pelas células malignas e/ou estromais do microambiente tumoral).

Galectina-3 na proliferação e sensibilidade à morte em células de melanoma murino Tm1.

Dentre as alterações adquiridas pelas células tumorais estão a auto-suficiência na produção de fatores de crescimento, capacidade ilimitada de replicação, insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento e a estímulos de morte. Essas alterações conferem importante vantagem adaptativa às células por promoverem um aumento na taxa proliferativa das mesmas (Hanahan & Weinberg, 2000). Nesse sentido, alguns trabalhos comprovaram a participação de galectina-3 na proliferação de células transformadas e não transformadas. Em 1998, Inohara e colaboradores mostraram pela primeira vez que galectina-3 estimula a proliferação de fibroblastos humanos através do domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD). Em

linfócitos T estimulados com fatores de crescimento específicos há um aumento na expressão de galectina-3, de modo que a inibição da expressão dessa lectina por oligonucleotídeos *antisense* torna essas células menos responsivas aos estímulos mitogênicos (Joo *et al.*, 2001), indicando que galectina-3 atue como um modelador do processo de proliferação. Essa ação proliferativa de galectina-3 também foi observada em células epiteliais humanas de mama (Lin *et al.*, 2002) e em células hepáticas esteladas de ratos (Maeda *et al.*, 2003).

Em células transformadas, galectina-3 pode atuar como indutor ou inibidor do processo de proliferação. Em células de tumor de mama humano MDA-MB435 transfectadas com cDNA *antisense* para o RNAm de galectina-3, os autores observaram redução na proliferação, sugerindo que galectina-3 endógena seja um importante modulador do crescimento dessas células (van den Brule *et al.*, 1997). Em células tumorais pituitárias, o silenciamento do gene de galectina-3 foi responsável pela inibição na taxa proliferativa dessas células (Riss *et al.*, 2003). O efeito proliferativo de galectina-3 também foi descrito em outras células tumorais como em linhagens de próstata (Ellerhorst *et al.*, 2002), de mama (Warfield *et al.*, 1997; Matarrese *et al.*, 2000; Honjo *et al.*, 2001; Lahm *et al.*, 2001) e tireóide (Yoshii *et al.*, 2001; Paron *et al.*, 2003; Takenaka *et al.*, 2003). Um dos aspectos avaliados no presente trabalho foi o crescimento (proliferação) de células de melanoma murino Tm1 em função dos níveis de galectina-3 expressos pelas mesmas. Com o intuito de averiguar essa hipótese, células de melanoma murino Tm1 foram transfectadas com o gene de galectina-3 e a taxa de proliferação determinada *in vitro*. Como ilustrado na Figura 2A, o acúmulo dessa lectina não altera a taxa proliferativa de células Tm1, indicando que galectina-3 não seja um modulador, positivo ou negativo, do processo de proliferação de células de melanoma murino (pelo menos *in vitro*).

Em 2002, Liu e colaboradores mostraram que a indução ou inibição da proliferação mediada por galectina-3 é dependente da localização celular dessa lectina (i.e. citoplasmática ou nuclear). Atualmente, acredita-se que as diferentes ações mediadas por galectina-3 sejam decorrente da sua localização extra ou intracelular e, nesse último caso, sua presença em distintos compartimentos seja um determinante de sua ação biológica final. Como observado na Figura 1, em células TM1 gal-3⁺, galectina-3 encontra-se tanto no núcleo como no citoplasma dessas células, sendo mais abundante nesse último compartimento. Entretanto, a presença dessa lectina, seja no núcleo ou citoplasma, parece não estar relacionada a modulação do crescimento de células de melanoma. Pouco se sabe a respeito dos mecanismos intracelulares envolvidos na ação proliferativa de galectina-3. Em 2002, Lin e colegas demonstraram que galectina-3 aumenta a atividade do promotor de ciclina D em células epiteliais de mama, promovendo, então, o crescimento dessas células. Curiosamente, células Tm1 apresentam maior nível de expressão de ciclinas do tipo D comparadas às células de melanócitos murino não transformadas, melan-a (tese de doutoramento de Andréia Hanada Otake, 2006). Essa ativação constitutiva de ciclinas do tipo D “mascararia”, então, uma possível ação de galectina-3 sobre essas moléculas reguladoras do ciclo celular, o que explicaria a ausência de um efeito promotor de crescimento de galectina-3 em células Tm1.

Alguns trabalhos atribuem o efeito de galectina-3 no ciclo celular à ação anti-apoptótica dessa molécula. Galectina-3 é capaz de proteger diferentes células a apoptose induzida por ciclohexamida, FasL (Fas ligante), cisplatina (dentre outros quimioterápicos), TNF- α (fator de necrose tumoral- α) e radiação ultravioleta (Liu *et al.*, 2002; Oka *et al.*, 2005; Fukumori *et al.*, 2006). Células Jurkat (linhagem celular de linfócitos T), por exemplo, transfectadas com o gene de galectina-3 são mais

resistentes ao tratamento com estaurosporina (indutor inespecífico de apoptose) e com o anticorpo anti-Fas comparados ao controle não transfectado (Yang *et al.*, 1996). Ainda, na linhagem de células epiteliais de mama, a superexpressão de galectina-3 aumenta a resistência das células a apoptose induzida por cisplatina, óxido nítrico, radiação e *anoikis* (apoptose induzida por perda de ancoragem) (Akahani *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999; Moon *et al.*, 2001). Apesar de galectina-3 não ser um membro da superfamília de Bcl-2, essa lectina exibe semelhanças estruturais a proteína anti-apoptótica Bcl-2. Ambas proteínas são ricas em glicina, alanina e prolina na extremidade amino-terminal e contêm o domínio NWGR (aspartato-triptofano-glicina-arginina) na região C terminal. Esse último, denominado domínio de morte, é crítico para função anti-apoptótica de Bcl-2. Essa seqüência é altamente conservada na estrutura de galectina-3 de diferentes espécies animais e é essencial para ligação a carboidratos dessa lectina (Nakahara *et al.*, 2005). Akahani e colaboradores (1997) demonstraram que a substituição de glicina por alanina no domínio NWGR de galectina-3 abole a resistência à apoptose induzida por cisplatina, indicando que esse domínio também é essencial para atividade anti-apoptótica de galectina-3. A resistência a morte de células tumorais é uma das alterações adquiridas ao longo do processo de tumorigênese responsáveis pela quimioresistência de tumores. Esses achados sugerem, então, que o acúmulo de galectina-3 no citoplasma de células malignas possa ser interpretado como mau prognóstico (Honjo *et al.*, 2000). Nesse contexto, foi avaliado se o acúmulo de galectina-3 no citoplasma de células Tm1 aumentaria a resistência dessas células à um estímulo de morte. Entretanto, células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ não apresentaram diferença de sensibilidade ao tratamento com doses crescentes de estaurosporina, um indutor inespecífico de apoptose (Figura 2B). Embora o mecanismo de ação anti-

apoptótico de galectina-3 ainda não tenha sido totalmente elucidado, pode-se especular que células de melanoma Tm1gal-3⁺ não expressem as moléculas com as quais essa lectina se associa para desempenhar sua ação anti-apoptótica e o efeito protetor de galectina-3 seria, então, célula-específico. Ainda, é possível que essa função de galectina-3 seja restrita a certos estímulos de morte que evocam vias de sinalização específicas e que não foram abordadas nesse estudo.

Em contrapartida, existem trabalhos que mostram que galectina-3 extracelular induz apoptose em timócitos e linfócitos T, atuando como importante modulador da homeostase de linfócitos (Fukumori *et al.*, 2003; Silva-Monteiro *et al.*, 2007). Essa ação pró-apoptótica de galectina-3 pode promover a progressão tumoral através da indução da morte de linfócitos T citotóxicos existentes no microambiente (Nakahara *et al.*, 2005). De fato, pacientes com tumores de mama, gastrointestinal, pulmão, linfoma não Hodgking, ovário e melanoma apresentam níveis séricos de galectina-3 elevados (Iurisci *et al.*, 2000), sugerindo uma ação sistêmica de galectina-3 na progressão de tumores. Recentemente, Zubieta e colaboradores (2006) demonstraram a existência de uma correlação positiva entre os níveis de expressão de galectina-3 (em células tumorais) e o número de linfócitos T intratumorais em apoptose em biópsias de melanoma. Sabe-se que galectina-3 é secretada para o meio extracelular, tanto por células não transformadas, como por células neoplásicas (Hughes, 1999; Zhu *et al.*, 2001); no entanto, não foi avaliado se células Tm1gal-3⁺ secretam galectina-3 para o meio extracelular. Uma hipótese a ser testada é verificar se as células Tm1gal-3⁺ secretam essa lectina para o meio extracelular, onde galectina-3 poderia atuar como um modulador do processo de morte, não nas células malignas, mas nas células estromais do microambiente de melanoma. Essa ação de galectina-3 poderia, então, promover ou inibir a progressão do tumor, dependendo da célula alvo

em questão (células T citotóxicas ou células “tróficas” que promovem o crescimento tumoral, por exemplo).

Galectina-3 na implantabilidade de melanoma murino *in vivo*.

O papel promotor de células inflamatórias no processo de tumorigênese já é bastante reconhecido. Sítios inflamatórios são ambientes permissivos ao aparecimento e desenvolvimento de tumores por serem ricos em citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, que induzem a proliferação celular, e em agentes mutagênicos (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio) produzidos pelas células inflamatórias- condições propícias para o surgimento de clones celulares transformados (Dvorak, 1986; Blakwill, 2001; Coussens & Werb., 2002; Li *et al.*, 2006).

Galectinas, em especial galectina-1 e -3, são importantes mediadores da resposta inflamatória inata e adquirida (Rabinovich *et al.*, 2002). Galectina-3 foi primeiramente definida como uma proteína ligante de IgE (ϵ BP), sugerindo a participação dessa lectina em processos alérgicos (revisado em Liu, 2005). Hoje já se sabe que galectina-3 é expressa em várias células inflamatórias, como monócitos e macrófagos, e que sua expressão é aumentada durante a inflamação (Sato & Hughes, 1994; Liu *et al.*, 1995; Dunic *et al.*, 2000; Nishiyama *et al.*, 2000; Kikuchi *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2004; Dabelic *et al.*, 2006). De fato, galectina-3 diminui a secreção de IL-5 por eosinófilos (Cortegano *et al.*, 1998), induz o *burst* oxidativo em neutrófilos (Karlsson *et al.*, 1998), aumenta a produção de IL-1 em monócitos (Jeng *et al.*, 1994), promove o recrutamento de leucócitos (Sato & Nieminem, 2004) e atua como quimiotático para monócitos e macrófagos (Sano *et al.*, 2000). Tendo em vista que galectina-3 não induz, diretamente, a proliferação de células Tm1 ou aumenta a sensibilidade das mesmas à morte celular, nos perguntamos se a expressão de

galectina-3 pelas células tumorais poderia gerar um ambiente inflamatório (recrutando monócitos para a massa tumoral, por exemplo) que favorecesse o crescimento de melanoma murino *in vivo*.

Primeiramente, avaliamos a cinética de implantação de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ em camundongos selvagens C57BL/6. Para tal, analisamos o estabelecimento de uma massa celular proliferativa (caracterizada pela positividade ao anticorpo anti-PCNA) e o recrutamento de células inflamatórias em diferentes períodos após o inóculo de células tumorais (Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺). As células inflamatórias foram caracterizadas pela imunomarcação como anticorpo anti-galectina-3 (essas células são de origem monocítica). Como ilustrado nas figuras 3B e 4B, 24 horas após a injeção de células, observa-se a presença de células galectina-3 infiltrantes no sítio do inóculo em ambos grupos experimentais. No entanto, nesse caso, esse infiltrado é decorrente, principalmente, da distensão tecidual causada pelo procedimento experimental (injeção da suspensão de células) no coxim plantar dos animais. Três dias após a injeção, nota-se um intenso infiltrado de células galectina-3 positivas na massa tumoral, independente do fenótipo celular inoculado (Figuras 3D e 4D). A densidade de células galectina-3 positivas diminui em função do tempo em ambos os grupos; 6 e 9 dias após a inoculação, essas células apresentam morfologia dendrítica característica comum de macrófagos ativados. Após 6 dias, observa-se o estabelecimento de uma massa tumoral consistente/definida imunorreativa para PCNA (i.e., composta por células proliferativas) com células monocíticas galectina-3 positivas em ambos os grupos (Figuras 3E, 3F, 3G, 3H, 4E, 4F, 4G e 4H), sugerindo que a cinética de implante de células Tm1gal-3⁻ e Tm1gal-3⁺ independe dos níveis de expressão de galectina-3 na célula tumoral. Nesse caso, galectina-3 não atua como modulador da reação inflamatória necessária para o implante de melanoma, o que

não exclui a possibilidade de galectina-3 modular etapas mais tardias do processo de progressão tumoral. Dados da literatura indicam que células inflamatórias estão envolvidas na implantabilidade e transformação maligna de melanócitos. Em 2005, Correa e colaboradores já haviam observado que o implante de células de melanoma murino Tm1 é facilitado pela reação inflamatória desencadeada no sítio de inoculação nas primeiras 72 horas após implante seguida de infiltrado de polimorfonucleares, macrófagos e células endoteliais. Em adição, alguns anos antes, Haghnegahdar e colegas (2000) elegantemente demonstraram que a transformação maligna de uma linhagem de melanócitos não tumorigênica (melan-a, da qual Tm1 é derivada) ocorre em resposta à exposição contínua das células às quimiocinas inflamatórias MGSA/GRO- α , - β e - γ , comprovando que, antes de promover o crescimento e conseqüente progressão, o processo inflamatório é relevante na transformação maligna de melanócitos. Assim, pelo menos nessa etapa da progressão de melanoma murino, galectina-3 expressa pelas células tumorais não interfere nesse processo.

Curiosamente, observamos a perda do acúmulo de galectina-3 nas células Tm1gal-3⁺ *in vivo* (Figura 4B, 4D, 4F e 4H, setas), sugerindo que pressões seletivas operantes no microambiente induzem o silenciamento do gene codificador de galectina-3 (em outras palavras, a expressão de galectina-3 nas células malignas parece não favorecer o crescimento de melanoma murino *in vivo*), corroborando os achados *in vitro* gerados no laboratório que mostram o silenciamento do gene de galectina-3 ao longo da progressão de melanoma murino (projeto de doutoramento de Verônica Rodrigues Teixeira), sugerindo que galectina-3 possa ser um modulador negativo do crescimento desses tumores.

Galectina-3 no crescimento tumoral de melanoma murino *in vivo*: evidências da participação de galectina-3 na angiogênese tumoral.

De fato, nosso próximo objetivo foi examinar o crescimento tumoral em função dos níveis de galectina-3 expressos pelas células de melanoma e, mais do que isso, pelas células estromais do microambiente tumoral. Para isso, animais selvagens e nocautes para o gene de galectina-3 foram inoculados com células Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺ e monitorados diariamente ao longo de 11 dias. Como ilustrado na figura 5A, observamos um retardo, de cerca de 1 dia, no aparecimento de tumores mensuráveis nos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺ e nos animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁻. Entretanto, a partir do 9º dia, não foram observadas diferenças no volume tumoral em função do tempo entre esses 3 grupos experimentais acima citados. Interessantemente, até o 11º dia, quando os animais foram sacrificados, os animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁺ não apresentavam tumores com dimensões mensuráveis. Após o sacrifício, os tumores foram extraídos e a média (aritmética) da massa tumoral de cada grupo encontra-se ilustrada na figura 5B. Independente do nível de expressão de galectina-3 pela célula tumoral, a massa tumoral em gramas dos animais nocautes é significativamente menor comparado aos animais selvagens. Esses resultados sugerem que galectina-3 atue como modulador, positivo e negativo, da progressão de melanoma murino, e que essa ação depende do tipo celular que expressa essa lectina no microambiente tumoral. Essa noção será melhor discutida e elaborada a seguir.

Os dados plotados na figura 5A indicam que a presença de células estromais que expressam galectina-3 favorece o crescimento de melanoma murino, uma vez que a taxa de crescimento tumoral nos animais nocautes é significativamente menor à observada nos animais selvagens (o que é refletido na massa em grama dos tumores). Independente do grupo experimental, esses tumores possuem pouca matriz

extracelular fibrosa e são compostos, principalmente, pelas células tumorais, células de origem monocítica, células endoteliais incorporadas a estruturas vasculares e raríssimas células CD34 positivas isoladas. Dentre esses tipos celulares, nossos dados mostram que as células monocíticas existentes no microambiente tumoral em animais selvagens expressam elevados níveis de galectina-3, tanto no citoplasma como no núcleo, e perfazem cerca de 12% das células do microambiente tumoral em ambos os grupos; percentual esse significativo e que sugere o envolvimento de células inflamatórias do sistema imune inato na progressão de melanoma murino. De fato, a importância de células inflamatórias na progressão tumoral foi claramente evidenciada nos últimos 20 anos. Assim como descrito em outros modelos de neoplasia maligna, Nesbit e colaboradores (2001) notificaram que o infiltrado inflamatório existente em melanoma promove o crescimento do mesmo. Outras quimiocinas inflamatórias como CXCL-1, -12, -8, -1, -13, CCL-17 e -22, que sabidamente estimulam o crescimento tumoral e o processo angiogênico, são encontradas no microambiente de melanomas (Wang *et al.*, 1990). A função biológica do infiltrado leucocitário em tumores, principalmente de macrófagos, tem sido intensamente investigada (Pollard, 2004). Hoje já se sabe que essas células são importantes fontes de fatores de crescimento para célula tumoral e de citocinas pró-angiogênicas, como VEGF, por exemplo, estimulando assim, direta ou indiretamente, o crescimento de tumores (Bando & Toi, 2000; Moldovan & Moldovan, 2005).

O papel de galectina-3 em processos inflamatórios já foi brevemente abordado anteriormente e nossos dados sugerem que a presença dessa lectina nas células monocíticas (precursoras de macrófagos) do microambiente tumoral é importante para o crescimento de melanoma murino. Essas células galectina-3

positivas seriam responsáveis pela criação de um microambiente inflamatório permissivo ao crescimento dos tumores (independente do fenótipo celular inoculado) nos animais selvagens. Então, pode-se hipotetizar que galectina-3 expressa pelas células monocíticas atua como uma molécula pró-inflamatória induzindo a secreção de citocinas e quimiocinas por essas células, sendo responsável não só pelo recrutamento contínuo de leucócitos tróficos para massa tumoral, mas também por induzir a proliferação das células tumorais e o processo de angiogênese. De fato, a interação entre células tumorais e células estromais inflamatórias ocorre através de certas interleucinas que promovem, de diversas maneiras, a progressão tumoral (Leek *et al.*, 1994; Wilson & Balkwill, 2002; Ariztia *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2006; Lu *et al.*, 2006). Galectina-3, em diferentes modelos animais de inflamação, induz a secreção de interleucinas como IL-1 e IL-8, por exemplo, por diferentes tipos celulares do sistema imune inato (Jeng *et al.*, 1994; Schroder *et al.*, 2006). Nas últimas décadas, muitos grupos descreveram o envolvimento de ambas interleucinas nas diferentes etapas da progressão de tumores, incluindo melanoma. Em 1994, Schadendorf e colaboradores observaram que a proliferação de células de melanoma é dependente da ação autócrina de IL-8. Nos anos seguintes, outros grupos verificaram a existência de uma correlação positiva entre níveis de IL-8 e estadio de melanoma (Hensley *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1999; Gutman *et al.*, 2002). O envolvimento de IL-8 no processo angiogênico e metastático em melanoma foi descrito por Bar-Eli (1999) e Dong *et al* (2005). Trabalhos que enfocam o papel de IL-8 e de células do microambiente tumoral, como neutrófilos, apontam para o envolvimento desse polimorfonuclear no crescimento de melanoma (Schaidler *et al.*, 2003; De Larco *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2006). A presença de células estromais galectina-3 positivas podem, então, promover a progressão de melanoma através da

secreção de interleucina-1 e -8 que sabidamente desempenham ação trófica nesse tipo de tumor. Ainda, a secreção de interleucina-1 (IL-1, uma citocina pleiotrópica envolvida em vários processos fisio e patológicos) e o aumento no recrutamento de leucócitos por galectina-3 já foram descritos em outros modelos de inflamação (Jeng *et al.*, 1994; Sato & Nieminem, 2004), sendo plausível sugerir que esses mesmos mecanismos sejam desencadeados por galectina-3 expressa pelas células estromais (monocíticas) no microambiente tumoral.

A correlação positiva entre galectina-3 das células estromais e a geração de um ambiente inflamatório pró-tumor por nós hipotetizada é corroborada pela menor taxa de crescimento dos tumores nos animais nocautes e por dados da literatura. Hsu e colaboradores (2000) mostraram que o infiltrado inflamatório é menor no peritônio de camundongos nulizigotos para o gene de galectina-3 em resposta a tioglicolato. Esse infiltrado mais atenuado é decorrente da diminuição na quantidade de macrófagos na cavidade peritoneal desses animais. Nesse contexto, Colnot e colaboradores (1998) já haviam observado também em animais galectina-3 nocautes que receberam injeção de tioglicolato, número reduzido de granulócitos na cavidade peritoneal, evidenciando a ação de galectina-3 na resposta inflamatória. Posteriormente, Sano e colaboradores (2003) mostraram que em camundongos nocautes para esse gene, a atividade fagocítica de macrófagos é reduzida, comprometendo o *clearance* de linfócitos apoptóticos e de microorganismos nesses animais. Os autores também demonstraram que esse efeito é decorrente de um mecanismo de ação intracelular de galectina-3, sugerindo que essa lectina seja importante na homeostase e funcionalidade de macrófagos (Beatty *et al.*, 2002). Em adição, sabe-se que a remoção de corpos apoptóticos por fagócitos na resposta tecidual a estresse genotóxico envolve a liberação de fatores como VEGF por essas

células (Fadok & Chimini, 2001). Como a ausência de galectina-3 em macrófagos compromete a atividade fagocítica das mesmas, podemos também especular que a atividade fagocítica dessas células, que se encontra comprometida nesses animais, seja fonte crucial de VEGF necessária para o crescimento do tumor. A identificação das células galectina-3 positivas e a caracterização do perfil de citocinas e quimiocinas existentes no microambiente tumoral dos 4 grupos experimentais estudados são cruciais para confirmar (ou refutar) as hipóteses acima mencionadas. De qualquer modo, podemos fazer uma analogia entre as células monocíticas galectina-3 negativas e positivas com os macrófagos intratumorais M1 e M2 (Mantovani *et al.*, 2002; Pollard, 2004; Van Ginderachter *et al.*, 2006): assim como os macrófagos M2, células monocíticas galectina-3 positivas desempenham ação trófica no microambiente tumoral, enquanto que as células galectina-3 negativas, a semelhança dos macrófagos M1, exibem ação tumoricida, justificando a menor taxa de crescimento dos tumores nos animais nocautes. Podemos ainda propor que a expressão de galectina-3 por macrófagos seja um dos determinantes do fenótipo M1 ou M2 desses fagócitos intratumorais.

O retardo no crescimento dos tumores nos animais nocautes pode também ser decorrente da resposta imune do hospedeiro contra o tumor. Bernardes e colaboradores (2006) mostraram que células esplênicas e dendríticas (CD11c⁺) de camundongos nocautes para galectina-3 secretam níveis elevados de interleucina-12 (IL-12), comparados aos animais selvagens, em resposta à infecção por *Toxoplasma gondii*. IL-12 é uma citocina envolvida na rejeição de diferentes tipos de tumores *in vivo*, cuja ação anti-tumoral é mediada por diferentes efetores como células NK (células *natural killer*), NKT (células NKT) e CTL (linfócitos T citotóxicos) (Cui *et al.*, 1997; Smyth *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2003; Brigl & Brenner,

2004). A possibilidade do retardo no aparecimento e crescimento tumoral observado nos animais nocautes para galectina-3 ser decorrente de um aumento nos níveis de IL-12 como resposta do hospedeiro a presença do tumor não deve ser descartada e merece ser melhor avaliada no futuro, verificando com marcadores específicos se esses tipos celulares estão presentes no microambiente desses tumores.

Outro achado curioso foi o retardo de 24 horas no aparecimento de tumores mensuráveis derivados de células Tm1gal-3⁺ nos animais selvagens em relação aos animais de mesmo fenótipo inoculados com células Tm1gal-3⁻ (Figura 5A), indicando que galectina-3 expressa pela célula tumoral retarda o crescimento desses tumores. O mesmo fenômeno foi observado nos animais nocautes, nos quais o retardo no aparecimento de massas tumorais palpáveis derivadas de células Tm1gal-3⁺ é ainda maior em relação ao grupo nocaute inoculado com células Tm1gal-3⁻, sugerindo, novamente, que dependendo do tipo celular em que se encontra, galectina-3 pode atuar como uma molécula pró ou anti-tumoral. Como o crescimento contínuo de tumores é dependente do processo de angiogênese (Folkman, 1972), avaliamos a área vascular e o número de vasos neoformados (CD34 positivos) no microambiente tumoral. Os animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺ apresentam menor área vascular e menor número de estruturas vasculares funcionais por área em relação ao grupo selvagem inoculado com Tm1gal-3⁻ (Figuras 6 e 7), justificando o retardo no surgimento de tumores mensuráveis anteriormente citado. Esses dados, juntamente com os apresentados nas Figuras 3 e 4, indicam que, quando expressa pela célula tumoral, galectina-3 retarda o crescimento, mas não a implantabilidade do tumor, sugerindo que essa molécula seja um regulador negativo do *switch* angiogênico (i.e., da aquisição do fenótipo angiogênico). Intrigante é o fato de, como já observado e mencionado anteriormente, as células deixam de acumular

galectina-3 ao longo da progressão tumoral *in vivo*, independente do fenótipo animal (Figuras 6B e 6C.), sugerindo que a presença transitória dessa lectina nas células tumorais é suficiente para gerar alterações no microambiente que retardam a formação de novos vasos e o crescimento dos tumores.

A transição de tumores avasculares para tumores entremeados por redes capilares é resultado de um desbalanço na produção de fatores anti- e pró-angiogênicos no microambiente tumoral (*switch* angiogênico), de modo que a quantidade de fatores pró- excede a de fatores anti-angiogênicos. Nessa fase, os tumores apresentam tamanho superior a 1mm³ e crescimento exponencial (Folkman, 1972). Apesar de inúmeros serem os grupos de pesquisa que trabalham nesse assunto, o mecanismo molecular envolvido nesse processo ainda é um tanto desconhecido. Fatores como a queda na pressão parcial de oxigênio (hipóxia), genes supressores tumorais e oncogenes, entre outros, estão envolvidos em tal mecanismo (Bergers & Benjamin, 2003). Dentre esses, galectina-3 tem sido descrita como mediador desse processo. Em 2000, Nangia-Makker e colaboradores mostraram o envolvimento dessa proteína na morfogênese de células endoteliais *in vitro*, sugerindo que galectina-3 poderia atuar como importante modulador na formação de vasos *in vivo*. *Insights* mecanísticos sobre a ação pró-angiogênica de galectina-3 foram propostos em 2004 (Fukushi *et al.*). Nesse trabalho, os autores mostram que NG2 (proteoglicano que apresenta grande quantidade de condroitin sulfato) solúvel promove a migração e a formação de túbulos via interação com galectina-3 e integrina $\alpha 3\beta 1$ expressos na membrana de células endoteliais. Rabinovich e colaboradores (2006) mostraram que inibidores sintéticos de galectina-3 são eficientes em abolir a interação celular homotípica e angiogênese mediada por essa lectina. Em contrapartida, Stitt e colaboradores (2005) observaram que a depleção de

galectina-3 do soro de pacientes diabéticos restaura a resposta neovascular em um modelo de retina tridimensional. *In vivo*, os autores verificaram que camundongos nocautes para galectina-3 apresentam resposta angiogênica mais intensa comparada aos selvagens em resposta a retinopatia induzida por oxigênio. Contudo, os autores propõem que galectina-3 não seja *per se* uma molécula anti-angiogênica, e sim que sua ação pró- ou anti-angiogênica seja dependente do microambiente em questão. Nossos dados sugerem que galectina-3 possa atuar indiretamente como uma molécula anti-angiogênica, i.e., a presença de galectina-3 nas células tumorais nas fases iniciais do implante de melanoma é responsável por “imprimir” diferenças no microambiente que modulam negativamente o processo angiogênico nessa neoplasia, retardando a aquisição do fenótipo angiogênico nesses tumores. Nesse sentido, essas diferenças poderiam modelar o comportamento de monócitos/macrófagos nos animais selvagens inoculados com células negativas para essa proteína, promovendo a ação trófica de macrófagos. A função tumoricida ou trófica desses leucócitos no microambiente tumoral reflete o perfil de citocinas e quimiocinas secretados pelas diferentes células aí existentes. Provavelmente, o padrão de cito e quimiocinas existentes nos tumores derivados de Tm1 transfectadas com galectina-3 induza a função tumoricida desses leucócitos, o que explicaria, pelo menos em parte, a menor densidade vascular observada. Uma comparação entre o perfil de expressão desses fatores nesses 2 grupos experimentais seria necessária para elucidação dos mecanismos responsáveis pelo fenômeno observado. Pode-se também especular que a presença de galectina-3 nas células tumorais (mesmo que transitória) induza a secreção de diferentes citocinas pelas mesmas que atraem para o microambiente células inflamatórias “tumorícidass”. Em outras palavras, os macrófagos “*primed*” por galectina-3 da célula tumoral nas primeiras horas após implante modulam

negativamente o processo de angiogênese, alterando o padrão de expressão e/ou síntese e/ou secreção de fatores anti-angiogênicos.

Diversos trabalhos demonstraram que o estroma tumoral exerce papel fundamental na angiogênese. Além das células transformadas, células estromais são importantes secretoras de fatores angiogênicos como VEGF, por exemplo. Dentro desse contexto, a função biológica do infiltrado leucocitário, principalmente de macrófagos, existente no microambiente de tumores sólidos tem sido intensamente investigada (revisado em Pollard, 2004). Em 1995, Lewis e colaboradores mostraram que as principais citocinas pró-angiogênicas em carcinoma de mama invasivo são produzidas pelas células epiteliais malignas e também por macrófagos presentes no infiltrado inflamatório (i.e., TAMs- *Tumor Associated-Macrophages*). Ainda em tumor de mama, Lin e colaboradores (2001) demonstraram que em camundongos nulizigotos para o gene *csf1^{op}* (gene codificador do fator estimulador de colônia 1- importante fator de crescimento de macrófagos), há um retardo na progressão de adenocarcinomas para carcinomas *in situ* e invasivos. Essa correlação positiva entre TAMs e promoção da progressão tumoral também foi observada em outros tumores como em pulmão (Malkinson, 2005), por exemplo. Esse infiltrado de macrófagos (e de outros leucócitos) no sítio tumoral é dependente do perfil de citocinas e quimiocinas expressas nesse microambiente. Em 2000, Sano e colaboradores demonstraram que galectina-3 humana recombinante promove a quimiotaxia de monócitos humanos. Assim, um dos objetivos desse estudo é verificar se a presença dessa lectina no microambiente de melanomas induz um maior recrutamento de monócitos para o sítio tumoral e se essas células poderiam promover a progressão de melanomas. Como ilustrado na figura 8, não foi observada diferença no número de células galectina-3 positivas nas massas tumorais derivadas de células Tm1

transfectadas ou não com o gene dessa proteína em animais selvagens. Essas células imunorreativas correspondem, em sua maioria, a células estromais, uma vez que as células tumorais transfectadas com o gene de galectina-3 deixam de acumular essa proteína *in vivo* (o que já havia sido observado anteriormente). Esses achados sugerem que galectina-3 expressa pelas células tumorais (nos primeiros momentos após implante nos animais) não atua como um quimiotático para monócitos/macrófagos; entretanto galectina-3 pode atuar na função (polarização) dos macrófagos, induzindo uma resposta pró- ou anti-tumoral.

Os animais nocautes inoculados com células Tm1gal-3⁺ também apresentaram menor a área vascular e número de vasos funcionais em relação ao grupo selvagem inoculados com Tm1gal-3⁻, além de menor massa tumoral, o que condiz com a hipótese de que galectina-3 expressa pelas células estromais exibe atividade pró-tumoral e, pelas células tumorais, anti-tumoral. Entretanto, esse mesmo grupo (nocaute) apresenta maior número de vasos funcionais comparado aos animais selvagens inoculados com células Tm1gal-3⁺. Esse resultado pode ser explicado por possíveis diferenças na pressão intersticial (PI) tumoral. A PI em tumores humanos e tumores sólidos experimentais é elevada comparada a tecidos “normais” (Jain *et al.*, 1994; Boucher *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1998; Heldin *et al.*, 2004; Hofmann *et al.*, 2006). As razões pelas quais a PI dos tumores é elevada ainda não são totalmente conhecidas, mas a formação de uma rede vascular intratumoral permeável, a ausência de uma rede linfática funcional e bem desenvolvida, e a participação de células do estroma contribuem para tal fenômeno. Nesse último caso, o infiltrado de macrófagos e de outros leucócitos inflamatórios no microambiente tumoral é também responsável pela secreção de citocinas como PDGF (fator de crescimento derivado de plaqueta), TGF- β (fator de crescimento transformante β) e VEGF que afetam a PI

(Heldin *et al.*, 2004; Salnikov *et al.*, 2006). Níveis elevados de VEGF aumentam a permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de proteínas plasmáticas e outras macromoléculas, aumentando a pressão osmótica no interstício do tumor. Como os níveis de VEGF são mais elevados nos tumores derivados de Tm1gal-3⁺ (pelo menos aparentemente; Figura 9) nos animais selvagens em relação ao nocaute, pode-se especular que a PI é maior no primeiro grupo e, por isso, o número total de estruturas vasculares (i.e, com ou sem hemácias) são similares, sugerindo também que a maturação dos vasos no grupo selvagem seja mais lenta que a dos animais nocautes. Apesar de não intuitivo, essa possível diferença na pressão intersticial entre esses 2 grupos também pode ser causa da diferença observada no crescimento tumoral, isso porque a PI mais elevada pode induzir um aumento na taxa proliferativa das células neoplásicas; entretanto, tal mecanismo ainda permanece um tanto obscuro (DiResta *et al.*, 2005; Salnikov *et al.*, 2006; Hofmann *et al.*, 2006). De qualquer forma, observamos que diferenças no microambiente de tumores modulam os mais distintos processos relacionados a tumorigênese e, em nosso caso, galectina-3 parece influenciar esses vários aspectos em função do tipo celular que a expressa.

Insight mecanístico do processo de angiogênese modulado por galectina-3 em melanoma murino.

A seguir, avaliamos o perfil de moléculas pró- e anti-angiogênicas no microambiente desses tumores. Dentre os genes analisados, a figura 10 mostra o nível de expressão do gene de VEGF nos animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁻ ou Tm1gal-3⁺. Dentre os fatores pró-angiogênicos descritos na literatura, VEGF é o melhor caracterizado deles. Assim como no processo de angiogênese em condições fisiológicas, VEGF é também fundamental na angiogênese tumoral. Muitas células tumorais secretam VEGF *in vitro* (Senger *et al.*, 1986); em tumores de pulmão,

mama, trato gastrointestinal, rim, bexiga, ovário, hemangioblastomas, melanomas, dentre outros, os níveis de RNAm para VEGF encontram-se aumentados. Ainda, pacientes portadores de diferentes tipos de tumores apresentam níveis séricos elevados de VEGF (revisado em Cross & Claesson-Welsh, 2001; Pappeti & Herman, 2002). Em adição a produção de VEGF pelas próprias células neoplásicas, os tumores podem induzir a produção e secreção desse fator de crescimento pelas células estromais do microambiente (Pappeti & Herman, 2002; Milkiewicz *et al.*, 2006). Em diferentes modelos de tumores experimentais, o *switch* angiogênico está relacionado ao aumento dessa citocina no microambiente tumoral (Shweiki *et al.*, 1995). Ao longo da progressão de melanoma, muitos grupos já relataram um aumento nos níveis de VEGF. Marcoval e colaboradores (1997) demonstraram que um aumento na expressão de VEGF e na rede vascular intratumoral estão associados à progressão de melanoma de crescimento radial para a fase de crescimento vertical. A produção e secreção de VEGF por células de melanoma e o aumento nos níveis desse fator na progressão dessa neoplasia de fase radial para vertical e para melanoma metastático também foi verificado por outros autores (Erhard *et al.*, 1997; Vacca *et al.*, 2000; Straume & Akslen, 2001; Varney *et al.*, 2005). Em 1997, Salven e colegas mostraram que os níveis de VEGF em melanoma são também produzidos por células inflamatórias intratumorais, contribuindo para a progressão do tumor. Como ilustrado na autorradiografia (Figura 9), observamos a expressão de RNAm de VEGF nos tumores derivados de células Tm1gal-3⁻ e gal-3⁺ nos animais selvagens; entretanto, no primeiro grupo, o nível de expressão gênica relativa de VEGF é cerca de 2,5 vezes maior comparado aos tumores originados de Tm1gal-3⁺, sugerindo que o crescimento e a densidade vascular desses tumores é dependente de VEGF, pelo menos nas fases de crescimento/progressão analisadas. De fato, observamos que a

área vascular e o número de vasos funcionais intratumorais nos animais selvagens inoculados com Tm1gal-3⁺ é menor que os inoculados com Tm1gal-3⁻, condizente com os menores níveis de VEGF observado no primeiro grupo. É possível que, assim como relatado para diversas linhagens de melanoma, células Tm1 produzam VEGF e que a presença de galectina-3, mesmo que transitória, nas células Tm1 possa modular negativamente (de maneira direta ou indireta) a transcrição desse gene, explicando os menores níveis de VEGF nesses tumores. Novamente, outra possibilidade é que as células estromais galectina-3 positivas tenham sido “educadas” pela galectina-3 da célula tumoral a desempenharem ação tumoricida, diminuindo a transcrição e síntese de VEGF. A secreção de certas citocinas por macrófagos intratumorais que induzem a secreção de VEGF já foi descrita em melanoma (Torisu *et al.*, 2000). Esses autores mostraram que a secreção de TNF- α e/ou IL-1 α por monócitos/macrófagos do microambiente tumoral estimulam a secreção de VEGF e IL-8 pelas células de melanoma, influenciando positivamente tanto o crescimento como a angiogênese nesses tumores. Seria interessante verificar se os monócitos/macrófagos “educados” por galectina-3 das células tumorais expressam ou não TNF- α e/ou IL-1 α , uma vez que essa lectina potencializa a secreção de IL-1 por monócitos (Jeng *et al.*, 1994).

Apesar da impossibilidade em mensurar os níveis de expressão gênica relativa de VEGF nos animais nocautes, os níveis de RNAm desse fator parecem ser menores nesses animais, o que condiz com a taxa de crescimento desses tumores. Entretanto, como já apontado anteriormente, a área vascular dos animais nocautes inoculados com Tm1gal-3⁺ é similar à encontrada na massa derivada do mesmo tipo celular em animais selvagens, ao passo que o número de vasos funcionais é maior nos nocautes, sugerindo que, apesar das possíveis diferenças na pressão intersticial tumoral, a presença de galectina-3 nas células estromais é necessária para produção

de VEGF e, na ausência desse fator angiogênico, outras citocinas de função redundante à VEGF sejam expressas no microambiente desses animais (ambas hipóteses não são excludentes ou exclusivas). A análise da expressão gênica de VEGF e de outros fatores pró- e anti-angiogênicos por uma técnica mais sensível como PCR em tempo real, por exemplo, é imprescindível para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos na resposta angiogênica nos diferentes microambientes.

Um dos principais estímulos a produção de VEGF em tumores sólidos é a queda nas pressões parciais de oxigênio (hipóxia). A presença de regiões hipóxicas na massa tumoral é um dos principais fatores responsáveis pela aquisição do fenótipo angiogênico (Xiong *et al.*, 1998; Laderoute *et al.*, 2000; Semenza, 2000; Fang *et al.*, 2001; Tonini *et al.*, 2003). A formação de tumores sólidos requer um “entrosamento” entre os processos de proliferação contínuo das células tumorais e angiogênese. Apesar da vasculatura existente nos tumores angiogênicos, a capacidade proliferativa das células malignas frequentemente sobrepuja a velocidade de formação de novos vasos e, como resultado, surgem áreas hipóxicas e necróticas na massa tumoral. A figura 11 mostra a porcentagem de áreas necróticas em ambos microambientes analisados. Os tumores originados de Tm1 gal-3⁻ nos animais selvagens apresentam maior extensão de área necrótica em relação aos selvagens e nocautes inoculados com Tm1 transfectadas com o gene dessa proteína. É plausível supor que essas áreas sejam decorrentes de regiões de hipóxia resultantes da proliferação exarcebada de células Tm1gal-3⁻ em relação à angiogênese. Contudo, tal suposição só poderá ser confirmada com marcadores específicos de regiões de hipóxia, como pimonidazol, que revelaria se essas áreas necróticas são realmente resultado da queda da pressão parcial de oxigênio. De qualquer modo, independente da causa, as áreas necróticas

existentes em tumores sólidos promovem o crescimento do mesmo. A morte de células por necrose ativa mecanismos inflamatórios e de reparo tecidual que promovem a angiogênese, estromagênese (*stromagenesis*) e a proliferação de epitélio, processos esses cruciais para a progressão tumoral (Dvorak et al., 1979; Leek et al., 1999, Ren et al., 2003; Vakkila & Lotze, 2004). Dessa forma, nossos achados refletem tal fenômeno acima descrito, uma vez que os tumores derivados de Tm1gal-3⁻ apresentam maior porcentagem de área necrótica e maior taxa de crescimento.

Finalizando, os resultados obtidos nesse projeto sugerem que a ação anti- ou pró-tumoral de galectina-3 no desenvolvimento de melanoma murino é função do tipo celular que a expressa e do microambiente em questão, ressaltando o conceito de que tumores são microambientes compostos por diferentes células que relacionam-se entre si, delineando a progressão tumoral. A idéia de que alguns fatores/moléculas exercem diferentes funções (às vezes antagônicas) dependendo do tipo de célula e/ou microambiente onde se encontram é cada vez mais freqüente e reflete, na realidade, a complexidade dos sistemas biológicos. A avaliação do microambiente tumoral nos animais nocautes inoculados com Tm1gal-3⁻ é imprescindível para melhor compreensão a respeito do papel de galectina-3 na progressão de melanoma e será avaliada futuramente.

CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Baseado nos objetivos específicos desse trabalho, observamos que:

1) Galectina-3 localiza-se no compartimento nuclear e citoplasmático de células Tm1 transfectadas com esse gene.

2) A presença de galectina-3 não confere vantagem proliferativa para células de melanoma murino Tm1 *in vitro*.

3) A presença de galectina-3 em células de melanoma murino Tm1 não confere resistência à apoptose induzida por estaurosporina *in vitro*.

4) Galectina-3 não modula a implantabilidade de células de melanoma murino Tm1 em camundongos selvagens C57Bl/6.

5) Fatores do microambiente tumoral induzem a diminuição na expressão do gene de galectina-3 em células de melanoma murino Tm1 transfectadas com esse o gene, sendo tal fenômeno observado 24 horas após o implante das células em camundongos selvagens C57BL/6.

6) A expressão de galectina-3 pelas células estromais do microambiente tumoral favorece o crescimento de melanoma murino.

7) Galectina-3 expressa pelas células tumorais atua como um modulador negativo do crescimento de melanoma murino *in vivo*, retardando a formação de novos vasos intratumorais através da diminuição nos níveis de RNA mensageiro de VEGF.

Em conclusão, galectina-3 desempenha um papel dual na progressão de melanoma murino, promovendo o crescimento do tumor quando expressa pelas células estromais do microambiente tumoral, ou retardando a aquisição do fenótipo angiogênico (*switch* angiogênico) pelo tumor, diminuindo, direta ou indiretamente, os níveis de VEGF, fator fundamental na angiogênese tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Rodriguez EV, Montes CL, Motran CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 mediates interleukin-4-induced survival and differentiation of B cells. Functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 2004; 172: 493–502.

Ahmad N, Gabius HJ, Andre S, Kaltner H, Sabesan S, Roy R, Liu B, Macaluso F, Brewer CF. Galectin-3 precipitates as a pentamer with synthetic multivalent carbohydrates and forms heterogeneous cross-linked complexes. **J Biol Chem.** 2004; 279(12):10841-7.

Akahani S, Nangia-Makker P, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3: a novel antiapoptotic molecule with a functional BH1 (NWGR) domain of Bcl-2 family. **Cancer Res.** 1997; 57(23):5272-6.

Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E. Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity **Nat Med.** 1995; 1:1024 - 1028.

Alvarez MJ, Prada F, Salvatierra E, Bravo AI, Lutzky VP, Carbone C, Pitossi FJ, Chuluyan HE, Podhajcer OL. Secreted protein acidic and rich in cysteine produced by human melanoma cells modulates polymorphonuclear leukocyte recruitment and antitumor cytotoxic capacity. **Cancer Res.** 2005; 65(12):5123-32.

Amann B, Perabo FG, Wirger A, Hugenschmidt H, Schultze-Seemann W. Urinary levels of monocyte chemo-attractant protein-1 correlate with tumour stage and grade in patients with bladder cancer. **Br J Urol.** 1998; 82(1):118-21.

Ariztia EV, Lee CJ, Gogoi R, Fishman DA. The tumor microenvironment: key to early detection. **Crit Rev Clin Lab Sci.** 2006; 43(5):393-425.

Axelrod R, Axelrod DE, Pienta KJ. Evolution of cooperation among tumor cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2006; 103(36):13474-9.

Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen R, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart J, Noel A. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. **Oncogene** 2004; 23: 6986-6990.

Bando H & Toi M. Tumor angiogenesis, macrophages, and cytokines. **Adv Exp Med Biol.** 2000; 476:267–84.

Barboni EA, Bawumia S, Hughes RC. Kinetic measurements of binding of galectin 3 to a laminin substratum. **Glycoconj J.** 1999; 16(7):365-73.

Bar-Eli M. Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. **Pathobiology** 1999;67(1):12-8.

Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A, Marme D. Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. **Blood** 1996; 87:3336–43.

Barondes SH, Castronovo V, Cooper DNW, Cummings RD, Drickamer K, Feizi T, Gitt MA, Hirabayashi J, Hughes RC, Kasai K, Leffler H, Liu E-T, Lotan R, Mercurio AM, Monsigny M, Pillai S, Poirier F, Raz A, Rigby P, Rini JM, Wang JL. Galectins: a family of animal beta-galactoside-binding lectins. **Cell** 1994; 76: 597-598.

Beacham DA & Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. **Semin Cancer Biol.** 2005; 15(5):329-41.

- Beatty WL, Rhoades ER, Hsu DK, Liu FT, Russell DG. Association of a macrophage galactoside-binding protein with Mycobacterium-containing phagosomes. **Cell Microbiol.** 2002; 4(3):167-76.
- Belotti D, Paganoni P, Manenti L, Garofalo A, Marchini S, Taraboletti G, Giavazzi R. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells: implications for ascites formation. **Cancer Res.** 2003; 63: 5224-5229.
- Bergers G & Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer** 2003;3 (6):401-10.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu T, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. **Nat Cell Biol.** 2000; 2: 737-744.
- Bergers G, Hanahan D, Coussens LM. Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis. **Int J Dev Biol.** 1998; 42(7):995-1002.
- Bernardes ES, Silva NM, Ruas LP, Mineo JR, Loyola AM, Hsu DK, Liu FT, Chammas R, Roque-Barreira MC. Toxoplasma gondii infection reveals a novel regulatory role for galectin-3 in the interface of innate and adaptive immunity. **Am J Pathol.** 2006; 168(6):1910-20.
- Boucher Y, Leunig M, Jain RK. Tumor angiogenesis and interstitial hypertension. **Cancer Res.** 1996; 56(18):4264-6.
- Brewer CF, Miceli MC, Baum LG. Clusters, bundles, arrays and lattices: novel mechanisms for lectin-saccharide-mediated cellular interactions. **Curr Opin Struct Biol.** 2002;12(5):616-23.
- Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? **Clin Exp Metastasis** 2002; 19:247–58.
- Brigl M & Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. **Annu Rev Immunol.** 2004; 22:817-90.
- Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. **J Immunol.** 2006; 176(1):284-90.
- Bussolino F, Di Renzo MF, Ziche M, Bocchietto E, Olivero M, Naldini L, Gaudino G, Tamagnone L, Coffe A, Comoglio PM. Hepatocyte growth factor is a potent angiogenic factor which stimulates endothelial cell motility and growth. **J Cell Biol.** 1992;119(3):629-41.
- Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). **J Cell Mol Med.** 2005; 9(4):777-94.
- Califice S, Castronovo V, Bracke M, van den Brule F. Dual activities of galectin-3 in human prostate cancer: tumor suppression of nuclear galectin-3 vs tumor promotion of cytoplasmic galectin-3. **Oncogene** 2004; 23(45):7527-36.
- Califice S, Castronovo V, Van Den Brule F. Galectin-3 and cancer **Int J Oncol.** 2004; 25(4):983-92.
- Carmeliet P & Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature.** 2000 14;407(6801):249-57.
- Carmeliet P, Dor Y, Herbert JM, Fukumura D, Brusselmans K, Dewerchin M, Neeman M, Bono F, Abramovitch R, Maxwell P, Koch CJ, Ratcliffe P, Moons L, Jain RK, Collen D, Keshert E. Role of

HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature** 1998; 394: 485–490.

Chiariotti L, Salvatore P, Benvenuto G, Bruni CB. Control of galectin gene expression. **Biochimie** 1999;81(4):381-8.

Chiariotti L, Salvatore P, Frunzio R, Bruni CB. Galectin genes: regulation of expression. **Glycoconj J**. 2004; 19(7-9):441-9.

Choi JH, Chun KH, Raz A, Lotan R. Inhibition of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide-induced apoptosis in breast cancer cells by galectin-3. **Cancer Biol Ther**. 2004;3(5):447-52.

Christofori G. The role of fibroblast growth factors in tumour progression and angiogenesis. In **Tumour Angiogenesis**, R. Bicknell, C.E. Lewis, and N. Ferrara, eds. (Oxford: Oxford University Press), 1996.

Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry D IV, et al. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. **J Natl Cancer Inst** 1989; 81:1893–904.

Clemente CG, Mihm MC, Jr., Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. **Cancer** 1996; 77:1303–10.

Cockerill GW, Gamble JR, Vadas MA. Angiogenesis: models and modulators. **Int Rev Cytol**. 1995; 159:113-60.

Colnot C, Ripoché MA, Milon G, Montagutelli X, Crocker PR, Poirier F. Maintenance of granulocyte numbers during acute peritonitis is defective in galectin-3-null mutant mice. **Immunology** 1998; 94(3):290-6.

Cooper DN, Barondes SH. Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. **J Cell Biol**. 1990; 110(5):1681-91.

Correa M, Machado J Jr, Carneiro CR, Pesquero JB, Bader M, Travassos LR, Chammas R, Jasiulionis MG. Transient inflammatory response induced by apoptotic cells is an important mediator of melanoma cell engraftment and growth. **Int J Cancer** 2005; 10;114(3):356-63.

Cortegano I, del Pozo V, Cardaba B, de Andres B, Gallardo S, del Amo A, Arrieta I, Jurado A, Palomino P, Liu FT, Lahoz C. Galectin-3 down-regulates IL-5 gene expression on different cell types. **J Immunol**. 1998; 1;161(1):385-9.

Coussens LM & Werb Z. Inflammation and cancer. **Nature** 2002, 420: 860–867.

Coussens LM & Werb Z. Inflammatory cells and cancer: think different! **J Exp Med**. 2001;193(6):F23-6.

Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. **Trends Pharmacol Sci**. 2001; 22(4):201-7.

Cui J, Shin T, Kawano T, Sato H, Kondo E, Toura I, Kaneko Y, Koseki H, Kanno M, Taniguchi M. Requirement for Valpha14 NKT cells in IL-12-mediated rejection of tumors. **Science** 1997; 278(5343):1623-6.

Dabelic S, Supraha S, Dumic J. Galectin-3 in macrophage-like cells exposed to immunomodulatory drugs. **Biochim Biophys Acta** 2006; 1760(4):701-9.

- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. **Science** 1994; 265: 1582–1584.
- De Larco JE, Wuertz BR, Furcht LT. The potential role of neutrophils in promoting the metastatic phenotype of tumors releasing interleukin-8. **Clin Cancer Res.** 2004; 10(15):4895-900.
- De Palma M & Naldini L. Role of haematopoietic cells and endothelial progenitors in tumour angiogenesis. **Biochim Biophys Acta** 2006; 1766(1):159-66.
- de Visser KE & Coussens LM. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer Immunol Immunother.** 2005; 54(11):1143-52.
- de Visser KE, Eichten A, Coussens LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nat Rev Cancer** 2006; 6(1):24-37.
- Debray C, Vereecken P, Belot N, Teillard P, Brion JP, Pandolfo M, Pochet R. Multifaceted role of galectin-3 on human glioblastoma cell motility. **Biochem Biophys Res Commun.** 2004; 325(4):1393-8.
- Demetriou M, Granovsky M, Quaggin S, Dennis JW. Negative regulation of T-cell activation and autoimmunity by Mgat5 N-glycosylation. **Nature** 2001; 8; 409(6821):733-9.
- Ding S, Merkulova-Rainon T, Han ZC, Tobelem G. HGF receptor up-regulation contributes to the angiogenic phenotype of human endothelial cells and promotes angiogenesis *in vitro*. **Blood** 2003; 101: 4816–4822.
- DiPietro LA & Polverini PJ. Angiogenic macrophages produce the angiogenic inhibitory thrombospondin 1. **Am J Pathol** 1993a, 43:678–684.
- DiPietro LA & Polverini PJ. Role of macrophage in the positive and negative regulation of wound neovascularization. **Behring Inst Mitt** 1993b, 92:238–247.
- Diresta GR, Nathan SS, Manoso MW, Casas-Ganem J, Wyatt C, Kubo T, Boland PJ, Athanasian EA, Miodownik J, Gorlick R, Healey JH. Cell proliferation of cultured human cancer cells are affected by the elevated tumor pressures that exist *in vivo*. **Ann Biomed Eng.** 2005; 33(9):1270-80.
- Dong C, Slattery MJ, Liang S, Peng HH. Melanoma cell extravasation under flow conditions is modulated by leukocytes and endogenously produced interleukin 8. **Mol Cell Biomech.** 2005; 2(3):145-59.
- Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ. Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. **Cell** 1997; 88(6): 801-10.
- Dumic J, Dabelic S, Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. **Biochim Biophys Acta** 2006;1760(4):616-35.
- Dumic J, Lauc G, Hadzija M, Flogel M. Transfer to in vitro conditions influences expression and intracellular distribution of galectin-3 in murine peritoneal macrophages. **Z Naturforsch [C]** 2000; 55(3-4):261-6.
- Dunn G, Bruce A, Ikeda H, Old L, Schreiber R. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol.** 2002; 3:991–8.
- Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **N Engl J Med.** 1986; 315(26):1650-9.

Dvorak, H. F., Dvorak, A. M., Manseau, E. J., Wiberg, L. & Churchill, W. H. Fibrin gel investment associated with line 1 and line 10 solid tumor growth, angiogenesis, and fibroplasia in guinea pigs. Role of cellular immunity, myofibroblasts, microvascular damage, and infarction in line 1 tumor regression. **J. Natl Cancer Inst.** 1979; 62: 1459–1472.

Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y. Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. **J Biol Chem.** 2004; 279(33):34922-30.

Elgert K, Alleva D, Mullins D. Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. **J Leukoc Biol.** 1998; 64:275–90.

Ellerhorst JA, Stephens LC, Nguyen T, Xu XC. Effects of galectin-3 expression on growth and tumorigenicity of the prostate cancer cell line LNCaP. **Prostate** 2002; 50(1):64-70.

Erhard H, Rietveld FJ, van Altena MC, Brocker EB, Ruiter DJ, de Waal RM. Transition of horizontal to vertical growth phase melanoma is accompanied by induction of vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. **Melanoma Res.** 1997; 7 Suppl 2:S19-26.

Fadok VA & Chimini G. The phagocytosis of apoptotic cells. **Semin Immunol.** 2001; 13(6):365-72.

Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA. HIF-1 α -mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. **Cancer Res.** 2001; 61(15):5731-5.

Ferrara N. Vascular endothelial growth factor. **Trends Cardiovasc. Med.**; 1993; (3): 244–250.

Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, Brunner N, Janicke F, Meijer-van Gelder ME, Henzen-Logmans SC, van Putten WL, Klijn JG. The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. **Cancer Res.** 2000; 60:636–43.

Folkman J & Hanahan D. Expression of the angiogenic phenotype during development of murine and human cancer. In: Origins of human cancer: a comprehensive review. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, USA.

Folkman J & Hanahan D. Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. **Princess Takamatsu Symp.** 1991; 22:339-47.

Folkman J & Klagsburn M. Angiogenic factors. **Science** 1987; 235:442–447.

Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. **Semin Cancer Biol.** 2003;13(2):159-67.

Folkman J. Angiogenesis inhibitors generated by tumors. **Mol Med.** 1995; 1(2):120-2.

Folkman J. Angiogenesis. **Annu Rev Med.** 2006; 57:1-18.

Folkman J. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **Ann Surg.** 1972; 175(3):409-16.

Fox SB, Taylor M, Grondahl-Hansen J, Kakolyris S, Gatter KC, Harris AL. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodelling in breast cancer. **J Pathol.** 2001;195:236–43.

Friesel RE & Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal. **FASEB J.** 1995; 9:919–925.

- Fukumori T, Oka N, Takenaka Y, Nangia-Makker P, Elsamman E, Kasai T, Shono M, Kanayama HO, Ellerhorst J, Lotan R, Raz A. Galectin-3 regulates mitochondrial stability and antiapoptotic function in response to anticancer drug in prostate cancer. **Cancer Res.** 2006; 66(6):3114-9.
- Fukumori T, Takenaka Y, Oka N, Yoshii T, Hogan V, Inohara H, Kanayama HO, Kim HR, Raz A. Endogenous galectin-3 determines the routing of CD95 apoptotic signaling pathways. **Cancer Res.** 2004; 64(10):3376-9.
- Fukumori T, Takenaka Y, Yoshii T, Kim HR, Hogan V, Inohara H, Kagawa S, Raz A. CD29 and CD7 mediate galectin-3-induced type II T-cell apoptosis. **Cancer Res.** 2003; 63: 8302–8311.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK, Seed B. Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. **Cell** 1998; 94: 715–725.
- Fukushi J, Makagiansar IT, Stallcup WB. NG2 proteoglycan promotes endothelial cell motility and angiogenesis via engagement of galectin-3 and alpha3beta1 integrin. **Mol Biol Cell** 2004; 15(8):3580-90.
- Gabius HJ & Wu AM. The emerging functionality of endogenous lectins: A primer to the concept and a case study on galectins including medical implications. **Chang Gung Med J.** 2006; 29(1):37-62.
- Gabius HJ, Siebert HC, Andre S, Jimenez-Barbero J, Rudiger H. Chemical biology of the sugar code. **Chembiochem.** 2004; 5(6):740-64.
- Gabius HJ. Biological information transfer beyond the genetic code: the sugar code. **Naturwissenschaften** 2000; 87(3):108-21.
- Gately S, Twardowsky P, Stack MS, Patrick M, Boggio L, Cundiff DL, Schnaper HW, Madison L, Volpert O, Bouck N, Enghild J, Kwaan HC, Soff GA. Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. **Cancer Res.** 1996; 56:4887–4990.
- Gatti L & Zunino F. Overview of tumor cell chemoresistance mechanisms. **Methods Mol Med.** 2005; 111:127-48.
- Gaudin JC, Arar C, Monsigny M, Legrand A. Modulation of the expression of the rabbit galectin-3 gene by p53 and c-Ha-ras proteins and PMA. **Glycobiology** 1997; 7(8):1089-98.
- Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. **Cancer Res.** 2003; 63(13):3805-11.
- Gloeckler Ries LA, Reichman ME, Lewis DR, Hankey BF, Edwards BK. Cancer survival and incidence from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program. **Oncologist** 2003; 8: 541–552.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, LeBeau, MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. A tumor suppressor dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. **Proc Natl Acad Sci USA** 1990; 87: 6624–6628.
- Gordower L, Decaestecker C, Kacem Y, Lemmers A, Gusman J, Burchert M, Danguy A, Gabius H, Salmon I, Kiss R, Camby I. Galectin-3 and galectin-3-binding site expression in human adult astrocytic tumours and related angiogenesis. **Neuropathol Appl Neurobiol.** 1999, 25(4):319-30.

Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P, Rosen EM. Scatter factor induces blood vessel formation *in vivo*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 1993; 90: 1937–1941.

Grassadonia A, Tinari N, Iurisci I, Piccolo E, Cumashi A, Innominato P, D'Egidio M, Natoli C, Piantelli M, Iacobelli S. 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. **Glycoconj J**. 2004; 19(7-9):551-6.

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. **Cell** 2004;118(3):285-96.

Grimshaw MJ, Wilson JL, Balkwill FR. Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. **Eur J Immunol**. 2002; 32:2393–400.

Gutman M, Even-Sapir E, Merimsky O, Trejo L, Klausner JM, Lev-Chelouche D. The role of interleukin-8 in the initiation and progression of human cutaneous melanoma. **Anticancer Res**. 2002; 22(6A):3395-8.

Haas T. Endothelial cell regulation of matrix metalloproteinases. **Can J Physiol Pharmacol**., 2005; 83: 1-7.

Haghnegahdar H, Du J, Wang D, Strieter RM, Burdick MD, Nanney LB, Cardwell N, Luan J, Shattuck-Brandt R, Richmond A. The tumorigenic and angiogenic effects of MGSA/GRO proteins in melanoma. **J Leukoc Biol**. 2000; 67(1):53-62.

Hanahan D & Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**. 1996; 86(3):353-64.

Hanahan D & Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000, 100(1):57-70 .

Harmey J & Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy **Bioessays** 2002; 24: 280 - 283.

Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK, McDonald DM. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. **Am J Pathol**. 2000;156(4):1363-80.

Heldin CH, Rubin K, Pietras K, Ostman A. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy. **Nat Rev Cancer** 2004; 4(10):806-13.

Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, Suda T, Takakura N. Hematopoietic cells regulate the angiogenic switch during tumorigenesis. **Blood** 2005; 105(7):2757-63.

Hensley C, Spitzler S, McAlpine BE, Lynn M, Ansel JC, Solomon AR, Armstrong CA. In vivo human melanoma cytokine production: inverse correlation of GM-CSF production with tumor depth. **Exp Dermatol**. 1998; 7(6):335-41.

Hildenbrand R, Glienke W, Magdolen V, Graeff H, Stutte HJ, Schmitt M. Urokinase receptor localization in breast cancer and benign lesions assessed by *in situ* hybridization and immunohistochemistry. **Histochem Cell Biol**. 1998;110:27–32.

Hildenbrand R, Wolf G, Bohme B, Bleyl U, Steinborn A. Urokinase plasminogen activator receptor (CD87) expression of tumor-associated macrophages in ductal carcinoma *in situ*, breast cancer, and resident macrophages of normal breast tissue. **J Leukoc Biol**. 1999; 66:40–9.

- Hirabayashi J & Kasai K. The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. **Glycobiology** 1993; 3(4):297-304.
- Hirabayashi J, Hashidate T, Arata Y, Nishi N, Nakamura T, Hirashima M, Urashima T, Oka T, Futai M, Muller WE, Yagi F, Kasai K. Oligosaccharide specificity of galectins: a search by frontal affinity chromatography. **Biochim Biophys Acta** 2002; 1572(2-3):232-54.
- Hiromatsu Y & Toda S. Mast cells and angiogenesis. **Microsc Res Tech.** 2003; 60(1):64-9.
- Hittelet A, Legendre H, Nagy N, Bronckart Y, Pector JC, Salmon I, Yeaton P, Gabius HJ, Kiss R, Camby I. Upregulation of galectins-1 and -3 in human colon cancer and their role in regulating cell migration. **Int J Cancer** 2003; 103(3):370-9.
- Hofmann M, Guschel M, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R, Tandi C, Wiig H, Kippenberger S. Lowering of tumor interstitial fluid pressure reduces tumor cell proliferation in a xenograft tumor model. **Neoplasia** 2006; 8(2):89-95.
- Honjo Y, Inohara H, Akahani S, Yoshii T, Takenaka Y, Yoshida J, Hattori K, Tomiyama Y, Raz A, Kubo T. Expression of cytoplasmic galectin-3 as a prognostic marker in tongue carcinoma. **Clin Cancer Res.** 2000; 6(12):4635-40.
- Honjo Y, Nangia-Makker P, Inohara H, Raz A. Down-regulation of galectin-3 suppresses tumorigenicity of human breast carcinoma cells. **Clin Cancer Res.** 2001; 7(3):661-8.
- Hoyer KK, Pang M, Gui D, Shintaku IP, Kuwabara I, Liu FT, Said JW, Baum LG, Teitell MA. An anti-apoptotic role for galectin-3 in diffuse large B-cell lymphomas. **Am J Pathol.** 2004; 164(3):893-902.
- Hsu DK & Liu FT. Regulation of cellular homeostasis by galectins. **Glycoconj J.** 2004; 19(7-9):507-15.
- Hsu DK, Hammes SR, Kuwabara I, Greene WC, Liu FT. Human T lymphotropic virus-I infection of human T lymphocytes induces expression of the beta-galactoside-binding lectin, galectin-3. **Am J Pathol.** 1996; 148(5):1661-70.
- Hsu DK, Yang RY, Pan Z, Yu L, Salomon DR, Fung-Leung WP, Liu FT. Targeted disruption of the galectin-3 gene results in attenuated peritoneal inflammatory responses. **Am J Pathol.** 2000; 156(3):1073-83.
- Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. **J Biol Chem.** 1992; 267(20):14167-74.
- Hughes RC. Galectins as modulators of cell adhesion. **Biochimie** 2001; 83(7):667-76.
- Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. **Biochim Biophys Acta** 1999; 1473(1):172-85.
- Hughes, RC. Lectins as cell adhesion molecules. **Curr. Opinion in Structural Biol.** 1992; 2:687-692.
- Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. **Nat Rev Cancer** 2003; 3(4):276-85.
- Inohara H, Akahani S, Raz A. Galectin-3 stimulates cell proliferation. **Exp Cell Res.** 1998; 245(2):294-302.

- Inoue M, Hager JH, Ferrara N, Gerber HP, Hanahan D VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. **Cancer Cell** 2002; 1(2):193-202.
- Iruela-Arispe ML & Dvorak HF. Angiogenesis: a dynamic balance of stimulators and inhibitors. **Thromb Haemost.** 1997; 78(1):672-7.
- Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(4):1389-93.
- Jablonska E, Piotrowski L, Jablonski J, Grabowska Z. VEGF in the culture of PMN and the serum in oral cavity cancer patients. **Oral Oncol.** 2002; 38(6):605-9.
- Jadus MR, Williams CC, Avina MD, Ly M, Kim S, Liu Y, Narasaki R, Lowell CA, Wepsic HT. Macrophages kill T9 glioma tumor cells bearing the membrane isoform of macrophage colony stimulating factor through a phagocytosis-dependent pathway. **J Immunol.** 1998, 160(1):361-8.
- Jain RK. The next frontier of molecular medicine: delivery of therapeutics. **Nat Med.** 1998; 4(6):655-7.
- Jain, RK. Barriers to drug delivery in solid tumors. **Sci Am.** 1994; 271(1):58-65.
- Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N. Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. **Endocrinology** 1993;133(2):848-59.
- Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. **Immunol Lett** 1994; 42(3):113-6.
- Joo HG, Goedegebuure PS, Sadanaga N, Nagoshi M, von Bernstorff M, Eberlein TJ. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. **J Leukoc Biol.** 2001; 69: 555–64.
- Kalluri R & Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer** 2006; 6(5):392-401.
- Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvany F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D, Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. **Cell** 1991; 66: 1095–1104.
- Kaplan R, Riba R, Zacharoulis S, Bramley A, Vincent L, Costa C, MacDonald D, Jin D, Shido K, Kerns S, Zhu Z, Hicklin D, Wu Y, Port J, Altorki N, Port E, Ruggero D, Shmelkov S, Jensen K, Rafii S, Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature** 2005; 438: 820 - 827.
- Karlsson A, Follin P, Leffler H, Dahlgren C. Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. **Blood** 1998; 91(9):3430-8.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. **Carcinogenesis** 2000; 21(3):505-15.
- Kikuchi Y, Kobayashi S, Hemmi N, Ikee R, Hyodo N, Saigusa T, Namikoshi T, Yamada M, Suzuki S, Miura S. Galectin-3-positive cell infiltration in human diabetic nephropathy. **Nephrol Dial Transplant** 2004; 19(3):602-7.
- Kim HR, Lin HM, Biliran H, Raz A. Cell cycle arrest and inhibition of anoikis by galectin-3 in human breast epithelial cells. **Cancer Res** 1999; 59: 4148–4154.

- Kim R, Emi M, Tanabe K, Arihiro K Tumor-driven evolution of immunosuppressive networks during malignant progression. **Cancer Res.** 2006; 66(11):5527-36.
- Knoop A, Andreassen PA, Andersen JA, Hansen S, Laenkholm AV, Simonsen AC, Andersen J, Overgaard J, Rose C. Prognostic significance of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in primary breast cancer. **Br J Cancer** 1998; 77:932–40.
- Koide N, Nishio A, Sato T, Sugiyama A, Miyagawa S. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Am J Gastroenterol.** 2004; 99(9):1667-74.
- Krzeslak A & Lipinska A. Galectin-3 as a multifunctional protein. **Cell Mol Biol Lett.** 2004; 9(2):305-28.
- Kuwabara I & Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. **J Immunol.** 1996; 156(10):3939-44.
- Kuwabara I, Sano H, Liu FT. Functions of galectins in cell adhesion and chemotaxis. **Methods Enzymol.** 2003; 363:532-52.
- Laderoute KR, Alarcon RM, Brody MD, Calaoagan JM, Chen EY, Knapp AM, Yun Z, Denko NC, Giaccia AJ. Opposing effects of hypoxia on expression of the angiogenic inhibitor thrombospondin 1 and the angiogenic inducer vascular endothelial growth factor. **Clin Cancer Res.** 2000; 6(7):2941-50.
- Lahm H, Andre S, Hoefflich A, Fischer JR, Sordat B, Kaltner H, Wolf E, Gabius HJ. Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. **J Cancer Res Clin Oncol.** 2001; 127(6):375-86.
- Le Marer N & Hughes RC. Effects of the carbohydrate-binding protein galectin-3 on the invasiveness of human breast carcinoma cells. **J Cell Physiol.** 1996; 168(1):51-8.
- Lee YJ, Song YK, Song JJ, Siervo-Sassi RR, Kim HR, Li L, Spitz DR, Lokshin A, Kim JH. Reconstitution of galectin-3 alters glutathione content and potentiates TRAIL-induced cytotoxicity by dephosphorylation of Akt. **Exp Cell Res.** 2003; 288(1):21-34.
- Leek RD & Harris AL. Tumor-associated macrophages in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2002; 7:177–89.
- Leek RD, Harris AL, Lewis CE. Cytokine networks in solid human tumors: regulation of angiogenesis. **J Leukoc Biol.** 1994; 56(4):423-35.
- Leek RD, Hunt NC, Landers RJ, Lewis CE, Royds JA, Harris AL. Macrophage infiltration is associated with VEGF and EGFR expression in breast cancer. **J Pathol.** 2000; 190:430–6.
- Leek, R. D., Landers, R. J., Harris, A. L. & Lewis, C. E. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. **Br. J. Cancer** 1999; 79: 991–995.
- Leffler H, Carlsson S, Hedlund M, Qian Y, Poirier F. Introduction to galectins. **Glycoconj J.** 2004; 19(7-9):433-40.
- Lewis CE, Leek R, Harris A, McGee JO. Cytokine regulation of angiogenesis in breast cancer: the role of tumor-associated macrophages. **J Leukoc Biol.** 1995; 57(5):747-51.
- Li HC, Stoicov C, Rogers AB, Houghton J. Stem cells and cancer: evidence for bone marrow stem cells in epithelial cancers. **World J Gastroenterol.** 2006; 12(3):363-71.

- Li J, Perrella MA, Tsai JC, Yet SF, Hsieh CM, Yoshizumi M, Patterson C, Endege WO, Zhou F, Lee ME. Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by interleukin-1 beta in rat aortic smooth muscle cells. **Journal of Biological Chemistry** 1995; 270, 308–312.
- Lin EY & Pollard JW. Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. **Br J Cancer** 2004; 90(11):2053-8.
- Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. **J Exp Med.** 2001; 193(6):727-40.
- Lin HM, Moon BK, Yu F, Kim HR. Galectin-3 mediates genistein-induced G(2)/M arrest and inhibits apoptosis. **Carcinogenesis** 2000; 21(11):1941-5.
- Lin HM, Pestell RG, Raz A, Kim HR. Galectin-3 enhances cyclin D(1) promoter activity through SP1 and a cAMP-responsive element in human breast epithelial cells. **Oncogene** 2002; 21(52):8001-10.
- Liu FT & Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. **Nat Rev Cancer** 2005; 5(1):29-41.
- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Hill PN, Shenhav A, Kuwabara I, Chen SS. Modulation of functional properties of galectin-3 by monoclonal antibodies binding to the non-lectin domains. **Biochemistry** 1996; 35(19):6073-9.
- Liu FT, Hsu DK, Zuberi RI, Kuwabara I, Chi EY, Henderson WR Jr. Expression and function of galectin-3, a beta-galactoside-binding lectin, in human monocytes and macrophages. **Am J Pathol.** 1995; 147(4):1016-28.
- Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. **Biochim Biophys Acta.** 2002; 1572(2-3):263-73.
- Liu FT. Regulatory roles of galectins in the immune response. **Int Arch Allergy Immunol.** 2005; 136(4):385-400.
- Loeffler S, Fayard B, Weis J, Weissenberger J. Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes *in vivo* and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. **International Journal of Cancer** 2005; 115: 202–213.
- Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. **Mol Cancer Res.** 2006; 4(4):221-33.
- Lynch C & Matrisian L. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication **Differentiation.** 2000; 70: 561 - 573.
- Maeda N, Kawada N, Seki S, Arakawa T, Ikeda K, Iwao H, Okuyama H, Hirabayashi J, Kasai K, Yoshizato K. Stimulation of proliferation of rat hepatic stellate cells by galectin-1 and galectin-3 through different intracellular signaling pathways. **J Biol Chem.** 2003; 278(21):18938-44.
- Makitie T, Summanen P, Tarkkanen A, Kivela T. Tumor-infiltrating macrophages (CD68(+) cells) and prognosis in malignant uveal melanoma. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2001; 42(7):1414-21.
- Malkinson AM. Role of inflammation in mouse lung tumorigenesis: a review. **Exp Lung Res.** 2005; 31(1):57-82.

- Mandriota S, Seghezzi G, Vassalli J, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper M. Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. **J Biol Chem.** 1995; 270: 9709-9716.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends Immunol.** 2004; 25(12):677-86.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. **Trends Immunol.** 2002 23(11):549-55.
- Marcovecchio J, Moreno A, Graells J, Vidal A, Escriba JM, Garcia-Ramirez M, Fabra A. Angiogenesis and malignant melanoma. Angiogenesis is related to the development of vertical (tumorigenic) growth phase. **J Cutan Pathol.** 1997; 24(4):212-8.
- Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, Islam M, Paul S, Pan Q, Hanash S, Kuick R, Merajver SD, Teknos TN. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Cancer** 2004; 101(12):2779-87.
- Matarrese P, Fusco O, Tinari N, Natoli C, Liu FT, Semeraro ML, Malorni W, Iacobelli S. Galectin-3 overexpression protects from apoptosis by improving cell adhesion properties. **Int J Cancer** 2000; 85(4):545-54.
- Matsushima K, Herlyn M. Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. **Int J Cancer.** 2003; 103(3):335-43.
- Mazurek N, Sun YJ, Price JE, Ramdas L, Schober W, Nangia-Makker P, Byrd JC, Raz A, Bresalier RS. Phosphorylation of galectin-3 contributes to malignant transformation of human epithelial cells via modulation of unique sets of genes. **Cancer Res.** 2005; 65(23):10767-75.
- Meininger CJ, Zetter BR. Mast cells and angiogenesis. **Semin Cancer Biol.** 1992; 3(2):73-9.
- Melo, FHM, Junqueira M de Souza, Chammas, R. Mecanismos de invasão e metástase. In: Bases da Oncologia, Brentani MM, Coelho, FRG, Kowalski LP. 2ª edição, 452 p. 2003.
- Melo, FHM. Exploração funcional do processo de glicosilação aberrante em tumores: mecanismos envolvidos na atividade pró-migratória de galectina-3. Tese de doutorado apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 183p. 2005.
- Mihm M, Clemente C, Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases—a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. **Lab Invest.** 1996; 74:43–7.
- Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. **Int J Biochem Cell Biol.** 2006; 38(3):333-57.
- Moldovan L & Moldovan NI. Role of monocytes and macrophages in angiogenesis. **EXS.** 2005; (94):127-46.
- Moon BK, Lee YJ, Battle P, Jessup JM, Raz A, Kim HR. Galectin-3 protects human breast carcinoma cells against nitric oxide-induced apoptosis: Implication of galectin-3 function during metastasis. **Am J Pathol** 2001; 159: 1055–1060.
- Mueller MM & Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4(11):839-49.

- Muller G, Behrens J, Nussbaumer U, Bohlen P, Birchmeier W. Inhibitory action of transforming growth factor b on endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 1987; 84:5600–5604.
- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H, Ohtani H. CD8⁺ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. **Cancer Res.** 1998; 58:3491–4.
- Nakahara S, Oka N, Raz A. On the role of galectin-3 in cancer apoptosis. **Apoptosis** 2005; 10(2):267-75.
- Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H. Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. **Cancer Res.** 2001; 61:5132–6.
- Nangia-Makker P, Baccarini S, Raz A. Carbohydrate-recognition and angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.** 2000; 19(1-2):51-7.
- Nangia-Makker P, Honjo Y, Sarvis R, Akahani S, Hogan V, Pienta KJ, Raz A. Galectin-3 induces endothelial cell morphogenesis and angiogenesis. **Am J Pathol.** 2000; 156(3):899-909.
- Nesbit M, Schaidt H, Miller TH, Herlyn M. Low-level monocyte chemoattractant protein-1 stimulation of monocytes leads to tumor formation in nontumorigenic melanoma cells. **J Immunol.** 2001; 166(11):6483-90.
- Neufeld G & Kessler O. Pro-angiogenic cytokines and their role in tumor angiogenesis. **Cancer Metastasis Rev.** 2006; 25(3):373-85.
- Nishiyama J, Kobayashi S, Ishida A, Nakabayashi I, Tajima O, Miura S, Katayama M, Nogami H. Up-regulation of galectin-3 in acute renal failure of the rat. **Am J Pathol.** 2000; 157(3):815-23.
- Novak EM, Metzger M, Chammas R, da Costa M, Dantas K, Manabe C, Pires J, de Oliveira AC, Bydlowski SP. Downregulation of TNF-alpha and VEGF expression by Sp1 decoy oligodeoxynucleotides in mouse melanoma tumor. **Gene Ther.** 2003, 10(23):1992-7.
- O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. **Cell** 1997; 88:277–285.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M., Lane WS, Cao Y, Sage EH, Folkman J. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediate the suppression of metastases by Lewis lung carcinoma. **Cell** 1994; 79:315–328.
- Oba-Shinjo SM, Correa M, Ricca TI, Molognoni F, Pinhal MA, Neves IA, Marie SK, Sampaio LO, Nader HB, Chammas R, Jasiulionis MG. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia** 2006; 8(3):231-41.
- Ochieng J, Furtak V, Lukyanov P. Extracellular functions of galectin-3. **Glycoconj J.** 2004; 19(7-9):527-35.
- O'Driscoll L, Linehan R, Liang YH, Joyce H, Oglesby I, Clynes M. Galectin-3 expression alters adhesion, motility and invasion in a lung cell line (DLKP) *in vitro*. **Anticancer Res.** 2002; 22(6A):3117-25.
- Ogmundsdottir HM, Petursdottir I, Gudmundsdottir I. Interactions between the immune system and breast cancer. **Acta Oncol.** 1995; 34:647–50.

- Oka N, Nakahara S, Takenaka Y, Fukumori T, Hogan V, Kanayama HO, Yanagawa T, Raz A. Galectin-3 inhibits tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by activating Akt in human bladder carcinoma cells. **Cancer Res.** 2005; 65(17):7546-53.
- Okamoto R, Ueno M, Yamada Y, Takahashi N, Sano H, Suda T, Takakura N.
- O'Sullivan C, Lewis CE, Harris AL, McGee JO. Secretion of epidermal growth factor by macrophages associated with breast carcinoma. **Lancet** 1993; 342:872-3.
- Otake, AH. Papel de dissialogangliosídeos na proliferação e morte celular induzida em melanócitos e melanomas *in vitro*. Tese de doutorado apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2005. 126p.
- Pages G, Milanini J, Richard D, Berra E, Gothie E, Vinals F, Pouyssegur J. Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase cascade. **Ann NY Acad Sci.** 2000; 902: 187 - 200.
- Park SH, Kyin T, Bendelac A, Carnaud C. The contribution of NKT cells, NK cells, and other gamma-chain-dependent non-T non-B cells to IL-12-mediated rejection of tumors. **J Immunol.** 2003; 170(3):1197-201.
- Paron I, Scaloni A, Pines A, Bachi A, Liu FT, Puppini C, Pandolfi M, Ledda L, Di Loreto C, Damante G, Tell G. Nuclear localization of Galectin-3 in transformed thyroid cells: a role in transcriptional regulation. **Biochem Biophys Res Commun.** 2003; 302(3):545-53.
- Peng HH, Liang S, Henderson AJ, Dong C. Regulation of interleukin-8 expression in melanoma-stimulated neutrophil inflammatory response. **Exp Cell Res.** 2006 [Epub ahead of print]
- Pepper M. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. **Arterioscler Thromb Vasc Bio.** 2001 21: 1104-1117.
- Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli J-D. Transforming growth factor b modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. **J Cell Biol.** 1990; 111:743-755.
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature** 2004; 431(7007):461-6.
- Poirier F, Timmons PM, Chan CT, Guenet JL, Rigby PW. Expression of the L14 lectin during mouse embryogenesis suggests multiple roles during pre- and post-implantation development. **Development** 1992; 115(1):143-55.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. **Nat Rev Cancer** 2004, 4(1):71-8.
- Polverini PJ. Macrophage induced angiogenesis: a review. **Cytokines** 1989, 1:54-73.
- Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM. Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. **Nature** 2006; 441(7092):437-43.
- Prager G, Breuss J, Steurer S, Olcaydu D, Mihaly J, Brunner P, Stockinger H, Binder B. Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. **Circ Res.** 2004; 94: 1562-1570.
- Qu Z, Liebler JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT. Mast cells are a major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. **Am J Pathol.** 1995; 147(3):564-73.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? **Trends Immunol.** 2002; 23(6):313-20.

Rabinovich GA, Cumashi A, Bianco GA, Ciavardelli D, Iurisci I, D'Egidio M, Piccolo E, Tinari N, Nifantiev N, Iacobelli S. Synthetic lactulose amines: novel class of anticancer agents that induce tumor-cell apoptosis and inhibit galectin-mediated homotypic cell aggregation and endothelial cell morphogenesis. **Glycobiology** 2006; 16(3):210-20.

Rabinovich GA. Galectins: an evolutionarily conserved family of animal lectins with multifunctional properties; a trip from the gene to clinical therapy. **Cell Death Differ.** 1999; 6(8):711-21.

Rak J & Yu JL. Oncogenes and tumor angiogenesis: the question of vascular "supply" and vascular "demand". **Semin Cancer Biol.** 2004; 14(2):93-104.

Rak J, Yu JL, Klement G, Kerbel RS. Oncogenes and angiogenesis: signaling three-dimensional tumor growth. **J Invest Dermatol Symp Proc.** 2000; 5(1):24-33.

Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumour growth factor- β -1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. **Cancer Res.** 1997; 57: 963–969.

Ren, G., Dewald, O. & Frangogiannis, N. G. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. **Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy** 2003; 2: 242–256.

Ribatti D, Crivellato E, Roccaro AM, Ria R, Vacca A. Mast cell contribution to angiogenesis related to tumour progression. **Clin Exp Allergy** 2004; 34(11):1660-4.

Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F. The role of mast cells in tumour angiogenesis. **Br J Haematol.** 2001; 115(3):514-21.

Rini JM & Lobsanov YD. New animal lectin structures. **Curr Opin Struct Biol.** 1999; 9(5):578-84.

Riss D, Jin L, Qian X, Bayliss J, Scheithauer BW, Young WF Jr, Vidal S, Kovacs K, Raz A, Lloyd RV. Differential expression of galectin-3 in pituitary tumors. **Cancer Res.** 2003; 63(9):2251-5.

Roberts AB & Sporn MB. Regulation of endothelial cell growth, architecture, and matrix synthesis by TGF- β 1. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1126–1128.

Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. **FEBS Lett.** 2006; 580(12):2879-87.

Kalebic, T and Garbisa, S and Glaser, B and Liotta, L. (1983) Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells *Science*, 221, pp. 281 - 283.

Saji H, Koike M, Yamori T, Saji S, Seiki M, Matsushima K, Toi M. Significant correlation of monocyte chemoattractant protein-1 expression with neovascularization and progression of breast carcinoma. **Cancer** 2001; 92(5):1085-91.

Salgado R, Vermeulen PB, Benoy, I, Weytjens R., Huget P, Van Marck E, Dirix LY. Platelet number and interleukin-6 correlate with VEGF but not with bFGF serum levels of advanced cancer patients. **British Journal of Cancer** 1999; 80: 892–897.

- Salnikov AV, Heldin NE, Stuhr LB, Wiig H, Gerber H, Reed RK, Rubin K. Inhibition of carcinoma cell-derived VEGF reduces inflammatory characteristics in xenograft carcinoma. **Int J Cancer** 2006; 119(12):2795-802.
- Salven P, Heikkilä P, Joensuu H. Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in metastatic melanoma. **Br J Cancer** 1997; 76(7):930-4.
- Salvesen HB, Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. **Int J Cancer** 1999; 84(5):538-43.
- Sano H, Hsu DK, Apgar JR, Yu L, Sharma BB, Kuwabara I, Izui S, Liu FT. Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. **J Clin Invest**. 2003; 112(3):389-97.
- Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. **J Immunol**. 2000; 165(4):2156-64.
- Sasaki S, Bao Q, Hughes RC. Galectin-3 modulates rat mesangial cell proliferation and matrix synthesis during experimental glomerulonephritis induced by anti-Thy1.1 antibodies. **J Pathol**. 1999; 187(4):481-9.
- Sato S & Hughes RC. Regulation of secretion and surface expression of Mac-2, a galactoside-binding protein of macrophages. **J Biol Chem**. 1994; 269(6):4424-30.
- Sato S & Nieminen J. Seeing strangers or announcing "danger": galectin-3 in two models of innate immunity. **Glycoconj J**. 2004; 19(7-9):583-91.
- Schadendorf, Moller, Algermissen, Worm, Sticherling, Czarnecki. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. **J Immunol**. 1994; 153(7):3360.
- Schaidt H, Oka M, Bogenrieder T, Nesbit M, Satyamoorthy K, Berking C. Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. **Int J Cancer**. 2003 Jan 20;103(3):335-43.
- Schroder AK, Uciechowski P, Fleischer D, Rink L. Crosslinking of CD66B on peripheral blood neutrophils mediates the release of interleukin-8 from intracellular storage. **Hum Immunol**. 2006; 67(9):676-82.
- Semenza GL. HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. **Cancer Metastasis Rev**. 2000; 19(1-2):59-65.
- Senger DR, Perruzzi CA, Feder J, Dvorak HF. A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. **Cancer Res**. 1986; 46(11):5629-32.
- Senger DR, Van de Water L, Brown LF, Nagy JA, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, Jackman V. Vascular permeability factor (VPF, VEGF) in tumor biology. **Cancer Metastasis Rev**. 1993;12(3-4):303-24.
- Shalom-Feuerstein R, Cooks T, Raz A, Kloog Y. Galectin-3 regulates a molecular switch from N-Ras to K-Ras usage in human breast carcinoma cells. **Cancer Res**. 2005; 65(16):7292-300.
- Shan S, Robson ND, Cao Y, Qiao T, Li CY, Kontos CD, Garcia-Blanco M, Dewhirst MW. Responses of vascular endothelial cells to angiogenic signaling are important for tumor cell survival. **FASEB J**. 2004; 18(2):326-8.

Sharma UC, Pokharel S, van Brakel TJ, van Berlo JH, Cleutjens JP, Schroen B, Andre S, Crijns HJ, Gabius HJ, Maessen J, Pinto YM. Galectin-3 marks activated macrophages in failure-prone hypertrophied hearts and contributes to cardiac dysfunction. **Circulation** 2004; 110(19):3121-8.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. **Blood** 1998; 92: 362–367.

Shi YH & Fang WG. Hypoxia-inducible factor-1 in tumor angiogenesis. *World J Gastroenterol.* 2004;10(8):1082-7.

Shimura T, Takenaka Y, Tsutsumi S, Hogan V, Kikuchi A, Raz A. Galectin-3, a novel binding partner of beta-catenin. **Cancer Res.** 2004; 64(18):6363-7.

Shweiki D, Neeman M, Itin A, Keshet E. Induction of vascular endothelial growth factor expression by hypoxia and by glucose deficiency in multicell spheroids: implications for tumor angiogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1995; 92(3):768-72.

Silva-Monteiro E, Lorenzato LR, Nihei OK, Junqueira M, Rabonovitch GA, Hsu DK, Liu, FT, Savino W, Chammas, R, Villa-Verde DMS. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am Journal of Pathol.** 2007; 170(2). No prelo.

Singh RK, Varney ML, Bucana CD, Johansson SL. Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. **Melanoma Res.** 1999; 9(4):383-7.

Smalley KS, Brafford PA, Herlyn M. Selective evolutionary pressure from the tissue microenvironment drives tumor progression. **Semin Cancer Biol.** 2005; 15(6):451-9.

Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI. NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. **Int Immunol.** 2001; 13(4):459-63.

Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. **J Exp Med.** 2000; 191(4):661-8.

Stitt AW, McGoldrick C, Rice-McCaldin A, McCance DR, Glenn JV, Hsu DK, Liu FT, Thorpe SR, Gardiner TA. Impaired retinal angiogenesis in diabetes: role of advanced glycation end products and galectin-3. **Diabetes** 2005; 54(3):785-94.

Straume O, Akslen LA. Expression of vascular endothelial growth factor, its receptors (FLT-1, KDR) and TSP-1 related to microvessel density and patient outcome in vertical growth phase melanomas. **Am J Pathol.** 2001; 159(1):223-35.

Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. **Eur J Cancer** 2006; 42(6):768-78.

Strik HM, Deininger MH, Frank B, Schluesener HJ, Meyermann R. Galectin-3: cellular distribution and correlation with WHO-grade in human gliomas. **J Neurooncol.** 2001; 53(1):13-20.

Szucs S, Kawai M, Varga C, Kertai P, Pocsai Z, Karanyi Z, Adany R. Changes in superoxide anion production and phagocytosis by circulating neutrophils during tumor progression in a rat model. **Cell Immunol.** 1996; 170(2):202-11.

Takenaka Y, Fukumori T, Raz A. Galectin-3 and metastasis. **Glycoconj J.** 2004; 19(7-9):543-9.

- Takenaka Y, Fukumori T, Yoshii T, Oka N, Inohara H, Kim HR, Bresalier RS, Raz A. Nuclear export of phosphorylated galectin-3 regulates its antiapoptotic activity in response to chemotherapeutic drugs. **Mol Cell Biol.** 2004; 24(10):4395-406.
- Takenaka Y, Inohara H, Yoshii T, Oshima K, Nakahara S, Akahani S, Honjo Y, Yamamoto Y, Raz A, Kubo T. Malignant transformation of thyroid follicular cells by galectin-3. **Cancer Lett.** 2003; 195(1):111-9.
- Tazawa H, Okada F, Kobayashi T, Tada M, Mori Y, Une Y, Sendo F, Kobayashi M, Hosokawa M. Infiltration of neutrophils is required for acquisition of metastatic phenotype of benign murine fibrosarcoma cells: implication of inflammation-associated carcinogenesis and tumor progression. **Am J Pathol.** 2003; 163(6):2221-32.
- Teixeira, VR. Mecanismos associados à perda de expressão do gene de galectina-3 em um modelo de progressão de melanoma murino. Tese de doutorado apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo 127p. 2007.
- Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. **Oncogene** 2003; 22(42):6549-56.
- Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNFalpha and IL-1alpha. **Int J Cancer** 2000; 85(2):182-8.
- Toy EP, Chambers JT, Kacinski BM, Flick MB, Chambers SK. The activated macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) receptor as a predictor of poor outcome in advanced epithelial ovarian carcinoma. **Gynecol Oncol.** 2001; 80(2):194-200.
- Tsung K, Dolan JP, Tsung YL, Norton JA. Macrophages as effector cells in interleukin 12-induced T cell-dependent tumor rejection. **Cancer Res.** 2002; 62:5069-75.
- Tsutsui S, Yasuda K, Suzuki K, Tahara K, Higashi H, Era S. Macrophage infiltration and its prognostic implications in breast cancer: the relationship with VEGF expression and microvessel density. **Oncol Rep.** 2005; 14(2):425-31.
- Vacca A, Ria R, Ribatti D, Bruno M, Dammacco F. Angiogenesis and tumor progression in melanoma. **Recenti Prog Med.** 2000; 91(11):581-7.
- Vakkila J & Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. **Nat Rev Immunol.** 2004; 4(8):641-8.
- Valkovic T, Lucin K, Krstulja M, Dobi-Babic R, Jonjic N. Expression of monocyte chemotactic protein-1 in human invasive ductal breast cancer. **Pathol Res Pract.** 1998; 194(5):335-40.
- Valter MM, Wiestler OD, Pietsche T. Differential control of VEGF synthesis and secretion in human glioma cells by IL-1 and EGF. **International Journal of Developmental Neuroscience** 1999; 17: 565-577.
- van den Brule F, Califice S, Castronovo V. Expression of galectins in cancer: a critical review. **Glycoconj J.** 2004; 19(7-9):537-42.
- van den Brule FA, Fernandez PL, Buicu C, Liu FT, Jackers P, Lambotte R, Castronovo V. Differential expression of galectin-1 and galectin-3 during first trimester human embryogenesis. **Dev Dyn.** 1997; 209(4):399-405.

- Van Ginderachter JA, Movahedi K, Hassanzadeh Ghassabeh G, Meerschaut S, Beschin A, Raes G, De Baetselier P. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology** 2006; 211(6-8):487-501.
- Varney ML, Johansson SL, Singh RK. Tumour-associated macrophage infiltration, neovascularization and aggressiveness in malignant melanoma: role of monocyte chemotactic protein-1 and vascular endothelial growth factor-A. **Melanoma Res.** 2005; 15(5):417-25.
- Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. **Eur J Immunol.** 2002; 32: 1434–44.
- Vosseler S, Mirancea N, Bohlen P, Mueller MM, Fusenig NE. Angiogenesis inhibition by vascular endothelial growth factor receptor-2 blockade reduces stromal matrix metalloproteinase expression, normalizes stromal tissue, and reverts epithelial tumor phenotype in surface heterotransplants. **Cancer Res.** 2005; 65(4):1294-305.
- Wang F, So J, Reierstad S, Fishman D. Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases. **Int J Cancer**, 2006; 118: 879 - 888.
- Wang JM, Taraboletti G, Matsushima K, Van Damme J, Mantovani A. Induction of haptotactic migration of melanoma cells by neutrophil activating protein/interleukin-8. **Biochem Biophys Res Commun.** 1990;169(1):165-70.
- Warfield PR, Makker PN, Raz A, Ochieng J. Adhesion of human breast carcinoma to extracellular matrix proteins is modulated by galectin-3. **Invasion Metastasis** 1997; 17(2):101-12.
- Wei LH, Kuo ML, Chen CA, Cheng WF, Cheng SP, Hsieh FJ, Hsieh CY. Interleukin-6 in cervical cancer: the relationship with vascular endothelial growth factor. **Gynecologic Oncology** 2001; 82: 49–56.
- Wilson J & Balkwill F. The role of cytokines in the epithelial cancer microenvironment. **Semin Cancer Biol.** 2002; 12(2):113-20.
- Wislez M, Rabbe N, Marchal J, Milleron B, Crestani B, Mayaud C, Antoine M, Soler P, Cadranet J. Hepatocyte growth factor production by neutrophils infiltrating bronchioloalveolar subtype pulmonary adenocarcinoma: role in tumor progression and death. **Cancer Res.** 2003; 63(6):1405-12.
- Witzenbichler B., Maisonpierre PC, Jones P, Yancopoulos GD, Isner JM. Chemotactic properties of angiopoietin-1 and -2, ligands for the endothelial-specific receptor tyrosine kinase Tie2. **Journal of Biological Chemistry** 1998; 273: 18514–18521.
- Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. **Am J Pathol.** 1998; 153(2):587-98.
- Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. **J Immunol.** 1995; 154(7):3479-87.
- Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP, Lin PC. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. **Cancer Cell** 2004; (6):409-421.
- Yang RY, Hill PN, Hsu DK, Liu FT. Role of the carboxyl-terminal lectin domain in self-association of galectin-3. **Biochemistry** 1998; 37(12):4086-92.

Yang RY, Hsu DK, Liu FT. Expression of galectin-3 modulates T-cell growth and apoptosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1996; 93(13):6737-42.

Yoshii T, Fukumori T, Honjo Y, Inohara H, Kim HR, Raz A. Galectin-3 phosphorylation is required for its anti-apoptotic function and cell cycle arrest. **J Biol Chem**. 2002; 277(9):6852-7.

Yoshii T, Inohara H, Takenaka Y, Honjo Y, Akahani S, Nomura T, Raz A, Kubo T. Galectin-3 maintains the transformed phenotype of thyroid papillary carcinoma cells. **Int J Oncol**. 2001; 18(4):787-92.

Yu F, Finley RL Jr, Raz A, Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. **J Biol Chem**. 2002; 277(18):15819-27.

Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, Makrigiannakis A, Gray H, Schlienger K, Liebman MN, Rubin SC, Coukos G. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. **N Eng J Med**. 2003; 348:203–13.

Zhang YW, Su Y, Volpert OV, Vande Woude GF. Hepatocyte growth factor/scatter factor mediates angiogenesis through positive VEGF and negative thrombospondin 1 regulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** 2003; 100: 12718–12723.

Zhu WH, MacIntyre A, Nicosia RF. Regulation of angiogenesis by vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in the rat aorta model: distinct temporal patterns of intracellular signaling correlate with induction of angiogenic sprouting. **American Journal of Pathology** 2002; 161: 823–830.

Zhu WQ, Ochieng J. Rapid release of intracellular galectin-3 from breast carcinoma cells by fetuin. **Cancer Res**. 2001; 61(5):1869-73.

Zivkovic M, Poljak-Blazi M, Zarkovic K, Mihaljevic D, Schaur RJ, Zarkovic N. Oxidative burst of neutrophils against melanoma B16-F10. **Cancer Lett**. 2007; 246(1-2):100-8.

Zou J, Glinsky VV, Landon LA, Matthews L, Deutscher SL. Peptides specific to the galectin-3 carbohydrate recognition domain inhibit metastasis-associated cancer cell adhesion. **Carcinogenesis** 2005; 26(2):309-18.

Zubieta MR, Furman D, Barrio M, Bravo AI, Domenichini E, Mordoh J. Galectin-3 expression correlates with apoptosis of tumor-associated lymphocytes in human melanoma biopsies. **Am J Pathol**. 2006; 168(5):1666-75.